

# **Funktionen von Interleukin-22 und seinem natürlichen Inhibitor und deren mögliche Bedeutung bei Psoriasis und Morbus Crohn**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologin Ellen Witte

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter/innen:

1. Prof. Dr. med. Hans-Dieter Volk
2. Prof. Dr. med. vet. Gottfried Alber
3. PD Dr. med. Dipl. Phys. Rotraut Mößner

Tag der mündlichen Prüfung: 03.06.2010

Gewidmet meinen Eltern  
Monika und Wilfried Witte

## ZUSAMMENFASSUNG

Interleukin(IL)-22, ein Zytokin der IL-10-Interferon-Familie, beeinflusst die Funktion von Gewebezellen, wirkt jedoch nicht auf Immunzellen. In dieser Arbeit konnte ich zeigen, dass IL-22 in Keratinozyten nur eine begrenzte Anzahl von Genen in ihrer Expression reguliert, was eine Hemmung der terminalen Differenzierung und eine Steigerung der antimikrobiellen Abwehr und der zellulären Mobilität bewirkt. Diese IL-22-Effekte konnten in vivo aufgrund ihrer Induzierbarkeit durch eine IL-22-Behandlung in Mäusen bestätigt werden und fanden sich darüber hinaus in der läsionalen Haut von Patienten mit Psoriasis wieder. Eine pathogenetische Rolle von IL-22 bei Psoriasis wurde durch eine gefundene Erhöhung der IL-22-Spiegel im Blut dieser Patienten und eine Korrelation dieser mit dem Schweregrad der Erkrankung untermauert. Eine Untersuchung der Wirkung von IL-22 auf Hepatozyten zeigte, dass IL-22 in diesen Zellen die Produktion des LPS-Bindungsproteins (LBP) steigert, welches in hohen Konzentrationen bakterielle Bestandteile neutralisiert. In vivo zeigte sich, dass eine IL-22-Gabe in der Maus eine verstärkte Expression von LBP in der Leber und erhöhte systemische LBP-Spiegel bewirkt. Diese Hepatozyten-spezifische IL-22-Wirkung spiegelte sich bei Patienten mit Morbus Crohn in erhöhten systemischen LBP-Spiegeln wieder. Bei der Psoriasis steht vor allem der regenerative Phänotyp der Keratinozyten, gekennzeichnet durch eine verminderte terminale Differenzierung und eine gesteigerte Mobilität, im Vordergrund und bildet die Ursache für die klinisch sichtbaren epidermalen Veränderungen. Demgegenüber könnte bei Morbus Crohn IL-22 durch die Induktion von hepatozytärem LBP zur Neutralisierung von durch die gestörte Darmbarriere ins Blut translozierte bakterielle LPS zur lokalen Begrenzung der Entzündung beitragen. Ausgehend von diesen Beobachtungen wäre eine IL-22-Neutralisierung bzw. IL-22-Applikation ein innovativer Therapieansatz für die Behandlung von Psoriasis und Morbus Crohn.

## **SCHLAGWORTE**

Interleukin

IL-22

IL-10-Interferon-Familie

Inflammation

Haut

Keratinozyt

Leber

Hepatozyt

Psoriasis

Morbus Crohn

## ABSTRACT

Interleukin(IL)-22, a cytokine belonging to the IL-10-Interferon-family, regulates the function of tissue cells, but not of immune cells. Here, I could show, that in keratinocytes IL-22 regulates the expression of a limited number of genes leading to an inhibition of the terminal differentiation and an increase of the antimicrobial defense and cellular mobility. These IL-22 effects were also confirmed in vivo as they could be induced in mice by IL-22-treatment and moreover, were also found to be present in the lesional skin of psoriasis patients. A pathogenetic role of IL-22 in psoriasis was substantiated by the finding that IL-22 level are elevated in the blood of these patients and correlated with the disease severity. By investigating the influence of IL-22 on hepatocytes, I found an increase of LPS-binding protein (LBP) production by IL-22, a protein which neutralizes bacterial components at high concentrations. In vivo, IL-22 treatment of mice led to a high hepatic LBP expression and elevated blood LBP level. This hepatocyte-specific IL-22 effect was reflected in patients with crohn's disease in elevated systemic LBP level. In psoriasis, especially the regenerative phenotype of keratinocytes, characterized by the distorted terminal differentiation and enhanced mobility, is a key feature and the basis for the clinically visible epidermal alterations. In contrast, in crohn's disease by inducing hepatic LBP production IL-22 likely contributes to the neutralisation of LPS translocated into the blood via the distorted intestinal barrier and thereby to a local limitation of inflammation. Based on these observations a neutralisation or application of IL-22 would be an innovative therapeutic approach for the treatment of psoriasis and crohn's disease, respectively.

## **KEY WORDS**

interleukin

IL-22

IL-10-Interferon-family

inflammation

skin

keratinocyte

liver

hepatocyte

Psoriasis

Crohn's disease

## Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>4</b>
1.1 Zytokine	4
1.2 Die IL-10–Interferon-Familie	6
1.3 IL-22 – ein Mitglied der IL-10–Interferon-Familie	13
1.3.1 Genstruktur und Proteinstruktur von IL-22	13
1.3.2 Zelluläre Quellen von IL-22	15
1.3.3 Zellulärer IL-22-Rezeptor und Signaltransduktion	18
1.3.4 Biologische Effekte von IL-22	20
1.3.5 IL-22BP – ein löslicher IL-22-Rezeptor	21
1.4 Ziel der Arbeit	22
<b>2 MATERIAL</b>	<b>24</b>
2.1 Zellkultur	24
2.1.1 Primäre Zellen	24
2.1.2 Zelllinien	24
2.1.3 Reagenzien zur Zellseparation	24
2.1.4 Medien, Mediumzusätze und Reagenzien zur Subkultivierung	25
2.1.5 Rekombinante Zytokine, Antikörper, lösliche Rezeptoren	25
2.1.6 Bakterielle Stimuli	26
2.1.7 Weitere Reagenzien für die Zellstimulation	26
2.1.8 Ausgewählte Verbrauchsmaterialien	26
2.1.9 Geräte	27
2.2 Durchflußzytometrie	27
2.2.1 Puffer und Pufferzusätze	27
2.2.2 Antikörper für die Durchflußzytometrie	27
2.2.3 Ausgewählte Verbrauchsmaterialien	28
2.2.4 Geräte	28
2.3 Westernblot-Analyse	28
2.3.1 Puffer und Pufferzusätze	28
2.3.2 Reagenzien und Kits	29
2.3.3 Antikörper	29
2.3.4 Ausgewählte Verbrauchsmaterialien	30

## **Inhaltsverzeichnis**

---

2.3.5	Geräte	30
<b>2.4</b>	<b>Molekularbiologie</b>	<b>31</b>
2.4.1	Reagenzien und Kits	31
2.4.2	Synthetische Oligonukleotide	32
2.4.3	Verbrauchsmaterialien	33
2.4.4	Geräte	33
<b>2.5</b>	<b>ELISA und ELISA-basierende Methoden</b>	<b>33</b>
2.5.1	ELISA-Kits	33
2.5.2	Immulite®-Reagenzien	33
2.5.3	Geräte	34
<b>2.6</b>	<b>Oberflächenplasmonresonanz</b>	<b>34</b>
2.6.1	Puffer und Pufferzusätze	34
2.6.2	Reagenzien und Kits	34
2.6.3	Rekombinante Zytokine, Antikörper, lösliche Rezeptoren	34
2.6.4	Verbrauchsmaterialien	34
2.6.5	Geräte	34
<b>2.7</b>	<b>Biologisches Material</b>	<b>35</b>
2.7.1	Mäuse	35
2.7.2	Patientenmaterial	35
2.7.3	Verbrauchsmaterialien	35
2.7.4	Reagenzien	35
<b>3</b>	<b>METHODEN</b>	<b>36</b>
<b>3.1</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>36</b>
3.1.1	Isolation und Stimulation von PBMC	36
3.1.2	Kultur und Stimulation von primären humanen Keratinozyten	37
3.1.3	Kultur und Stimulation von primären humanen Fibroblasten, Endothelzellen und Melanozyten	38
3.1.4	Kultur und Stimulation von primären humanen Hepatozyten	39
3.1.5	Kultur und Stimulation von HepG2-Zellen	39
3.1.6	Beschichtung von Kulturgefäßen	40
<b>3.2</b>	<b>Durchflußzytometrie</b>	<b>40</b>
3.2.1	Zellfärbung	41
3.2.2	Analyse mittels Durchflußzytometrie	42
<b>3.3</b>	<b>Westernblot-Analyse</b>	<b>42</b>
3.3.1	Zelllyse	42
3.3.2	Proteinquantifizierung	43
3.3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	43



## **Inhaltsverzeichnis**

---

3.3.4	Blotting	44
3.3.5	Immunnachweis	44
3.3.6	Signalentwicklung	45
<b>3.4</b>	<b>Genexpressionsanalyse</b>	<b>45</b>
3.4.1	RNA-Isolierung	45
3.4.2	cDNA-Synthese	46
3.4.3	TaqMan-PCR	46
3.4.4	cDNA-Microarray-Analyse	48
<b>3.5</b>	<b>ELISA und ELISA-basierende Methoden</b>	<b>48</b>
3.5.1	Nachweis von IL-22, IFN- $\gamma$ , IL17A und mLBP	49
3.5.2	Nachweis von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ und hLBP	49
<b>3.6</b>	<b>Oberflächenplasmonresonanz</b>	<b>50</b>
3.6.1	BIACORE® Technologie	50
3.6.2	Immobilisierung	51
3.6.3	Analyse der Bindungsaffinität	52
<b>3.7</b>	<b>In vivo Untersuchungen</b>	<b>53</b>
3.7.1	Tierexperimente	53
3.7.2	Probenentnahme bei Patienten und gesunden Kontrollprobanden	53
<b>3.8</b>	<b>Statistische Analyse</b>	<b>54</b>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>56</b>
<b>4.1</b>	<b>Produktion von IL-22</b>	<b>56</b>
4.1.1	Produktion von IL-22 <i>in vitro</i>	56
4.1.1.1	Produktion von IL-22 durch Immunzellen	56
4.1.1.2	Produktion von IL-22 durch Gewebezellen	58
4.1.2	Produktion von IL-22 bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen	59
<b>4.2</b>	<b>Zielzellen von IL-22</b>	<b>65</b>
4.2.1	Zielzellen von IL-22 in der Haut	65
4.2.1.1	IL-22-Rezeptorexpression in Gewebezellen der Haut	65
4.2.1.2	Funktionelle Testung der Sensitivität von Gewebezellen der Haut gegenüber IL-22	67
4.2.2	Hepatozyten als Zielzellen von IL-22	73
4.2.2.1	IL-22-Rezeptorexpression in Hepatozyten	73
4.2.2.2	Signaltransduktion von IL-22 in Hepatozyten	73
<b>4.3</b>	<b>Effekte von IL-22</b>	<b>76</b>
4.3.1	Effekte von IL-22 auf Keratinozyten	76
4.3.2	Effekte von IL-22 auf Hepatozyten	88
4.3.3	Effekte von IL-22 und chronisch-entzündliche Erkrankungen	95
4.3.3.1	Effekte von IL-22 und Psoriasis	95

## Inhaltsverzeichnis

---

4.3.3.2	Effekte von IL-22 und Morbus Crohn	97
<b>4.4</b>	<b>Biologische Rolle von IL-22BP</b>	<b>98</b>
4.4.1	Affinität von IL-22BP zu IL-22	98
4.4.2	Regulation der IL-22-Aktivität durch IL-22BP <i>in vitro</i>	101
4.4.3	mRNA-Expression von IL-22BP in chronisch-entzündlichen Erkrankungen	102
4.4.4	Quantitativer Proteinnachweis von IL-22BP	103
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>106</b>
<b>5.1</b>	<b>Produktion, Zielzellen und Effekte von IL-22 und die Rolle von IL-22BP</b>	<b>106</b>
<b>5.2</b>	<b>Mögliche Relevanz der IL-22-Effekte für chronisch-entzündliche Erkrankungen</b>	<b>109</b>
5.2.1	Mögliche biologische Rolle von IL-22 bei Psoriasis	109
5.2.2	Mögliche biologische Rolle von IL-22 bei Morbus Crohn	114
<b>5.3</b>	<b>Bedeutung von IL-22 als Zielmolekül bei der Behandlung chronisch-entzündlicher Erkrankungen</b>	<b>118</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>121</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>155</b>
	<b>Veröffentlichungen</b>	<b>157</b>
	<b>Erklärung</b>	<b>161</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

Abb.	Abbildung
Act D	Actinomycin D
Ak	Antikörper
ANXA9	Annexin A9
APC	Allophycocyanin
AS	Aminosäure
BD	β-Defensin
Bp	Basenpaar
Bref A	Brefeldin A
BSA	bovines Serumalbumin
Ca <sup>2+</sup>	Calcium-Ionen
CALML5	Calmodulin like 5
CD	Cluster der Differenzierung („cluster of differentiation“)
CDAI	„crohn`s disease activity index“
cDNA	komplementäre DNA („complementary DNA“)
CHX	Cycloheximid
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
ConA	Concavalin A
CRF2	Zytokinrezeptor-Familie der Klasse 2 („cytokine receptor family class 2“)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DC	dendritische Zelle
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
DSC1	Desmocollin 1
DSS	Natriumdextransulfat („dextran sulfate sodium“)
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)-carbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

EGTA	Ethylenglykoltetraessigsäure
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunadsorptionsnachweis („enzyme-linked immunosorbent assay“)
EMEM	Minimal-essentielles Eagle Medium („minimal essential medium eagle“)
Erk	Extrazellulär-regulierte-Kinase („extracellular signal-regulated kinase“)
FACS	Durchflußzytometrie, Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung („fluorescence activated cell sorting“)
FAM	6-Crboxy-Fluoreszein
FBS	fetales bovines Serum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FLG	Profilaggrin
FSC	Forwärtsstreulicht („forward scatter“)
h	Stunde
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase-1
hu	human
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
I $\kappa$ B	Inhibitor von $\kappa$ B
IL	Interleukin
IL-22BP	IL-22-Bindungsprotein
i.p.	intraperitoneal
Jak	Janus-Kinase
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KRT	Keratin
kDa	Kilodalton
KDAP	Keratinocyte differentiation associated protein
KLK7	Kallikrein 7
LBP	LPS-Bindungsprotein
LPS	Lipopolysaccharid
m	murin
MA	Methylamin
mAk	monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MFI	mittlere Fluoreszenz-Intensität
$\mu$ g	Mikrogramm
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium-Ionen

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex („major histocompatibility complex“)
min	Minute
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	Boten-RNA („messenger RNA“)
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natrimhydrogencarbonat
NEAA	nichtessentielle Aminosäuren („non essential amino acids“)
NFκB	Nukleärer Faktor kappa B
NHS	N-Hydroxysuccinimid
P-	Phospho-
pAk	polyklonaler Antikörper
PAP1	Pankreatitis-assoziiertes Protein-1
PASI	„psoriasis area and severity index“
PBMC	mononukleäre Zellen des peripheren Bluts („peripheral blood mononuclear cells“)
PBS	Phosphat-gepufferte Saline („phosphate buffered saline“)
PC5	R-Phycoerythrin-Cyanin 5
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PE	R-Phycoerythrin
PTX	Pertussis Toxin
qPCR	quantitative „real time“ PCR mit revers transkribierter mRNA
R	Rezeptor
RA	Rezeptor-Antagonist
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
rh	rekombinant human
RHE	Rekonstituierte humane Epidermis
rm	rekombinant murin
RT-PCR	PCR mit revers transkribierter mRNA
S100A7	Psoriasin
S100A8	Calgranulin A
S100A9	Calgranulin B
SAC	<i>Staphylococcus aureus</i> Zellen
SAA	Serum-Amyloid A

s	Sekunde
SOCS	Suppressor der Zytokinsignalweiterleitung ("suppressor of cytokine signaling")
SPR	Oberflächenplasmonresonanz ("surface plasmon resonance")
SSC	Seitwärtsstreulicht („side scatter“)
STAT	Signaltransduktor und Aktivator der Transkription („signal transducer and activator of transcription“)
Tab.	Tabelle
Th	T-Helferzelle
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
Tyk	Tyrosinkinase
Upm	Umdrehungen pro Minute

## Zusammenfassung

Interleukin(IL)-22 ist ein im Jahr 2000 entdecktes Mitglied der IL-10–Interferon-Familie, welches seine Wirkung durch einen heterodimeren Rezeptor bestehend aus den Rezeptorketten IL-22R1 und IL-10R2 vermittelt und vor allem auf Gewebezellen äußerer Körperbarrieren, nicht jedoch auf Immunzellen wirkt. Um das Wissen über IL-22 zu erweitern, war es das Ziel dieser Arbeit, die Produktion von IL-22, die Zielzellen von IL-22 in der Haut und der Leber, die Effekte von IL-22 auf die in der Haut und der Leber identifizierten Hauptzielzellen sowie die Rolle des IL-22-Bindungsproteins (IL-22BP) näher zu beleuchten. Der Fokus der Arbeit sollte dabei vor allem auf der Charakterisierung der Effekte von IL-22 auf die Hauptzielzellen in der Haut und der Leber liegen.

Für die Analyse der **Produktion von IL-22** wurden humane Blutimmunzellen, sowie humane primäre Keratinozyten und Hepatozyten unter verschiedenen Bedingungen hinsichtlich ihrer Produktion von IL-22-Protein untersucht. Dabei zeigte sich, daß eine Sekretion von IL-22 durch Immunzellen nach Stimulation mit IL-2/IL-12 und Anti-CD3-Antikörper induziert wurde, während Lipopolysaccharid (LPS) und *Staphylococcus aureus* Zellen keinen klaren Effekt zeigten. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, daß primäre Keratinozyten und Hepatozyten kein IL-22 produzieren. Diese Ergebnisse stehen somit im Einklang mit der bereits bekannten Regulation der IL-22-Expression auf mRNA-Ebene in diesen Zellen und bestätigen, daß aktivierte T- und aktivierte NK-Zellen, nicht jedoch Monozyten oder B-Zellen sowie Gewebezellen Produzenten von IL-22 darstellen. Im Weiteren konnte erstmalig gezeigt werden, daß in den chronisch-entzündlichen Erkrankungen Psoriasis und Morbus Crohn die Plasmaspiegel von IL-22 signifikant erhöht waren und mit dem Schweregrad der Erkrankungen korrelierten. Interessanterweise war keine Erhöhung der systemischen Spiegel von IFN- $\gamma$ , IL-17A und IL-1 $\beta$  bei diesen Patienten zu finden. Passend zu den erhöhten IL-22-Plasmaspiegeln bei Morbus-Crohn-Patienten, wurde eine Erhöhung der mRNA-Expression von IL-22 in dem murinen Modell der experimentellen DSS-induzierten Kolitis im entzündeten Kolon und in geringerem Maße auch in den drainierenden Lymphknoten gefunden. Dies lässt vermuten, daß die erhöhten systemischen IL-22-Spiegel sowohl durch eine Produktion im entzündeten Gewebe als auch in den lokalen Lymphknoten bedingt sind.

Um die **Zielzellen von IL-22** in der humanen Haut und der humanen Leber zu erfassen, wurde die mRNA-Expression der IL-22-Rezeptorkomponenten sowie die Sensitivität der verschiedenen Zelltypen der Haut und der Hepatozyten gegenüber IL-22 untersucht. Eine klare IL-22-Rezeptorexpression und -sensitivität wurde nicht in dermalen Fibroblasten, dermalen Endothelzellen oder Melanozyten, jedoch in Keratinozyten sowie in Hepatozyten nachgewiesen und identifiziert diese als Hauptzielzellen von IL-22 in der

Haut und der Leber. Während IL-22 in Keratinozyten eine Tyrosinphosphorylierung von STAT3 und bei einem von vier Experimenten mit Keratinozyten unterschiedlicher Spender auch eine verstärkte Threonin-/Tyrosinphosphorylierung von Erk1/2 und JNK induzierte, wurde in Hepatozyten eine Aktivierung von STAT3 und in geringerem Maße auch von STAT1 durch IL-22 gefunden.

Für die Untersuchung der **Effekte von IL-22** auf Keratinozyten wurde eine Genexpressionsarray-Analyse mit nachfolgender Bestätigung der identifizierten Effekte mittels quantitativer RT-PCR und Proteinnachweis durchgeführt. Interessanterweise beeinflusst IL-22 in Keratinozyten nur eine sehr begrenzte Anzahl von Genen in ihrer Expression. IL-22 bewirkte die Regulation der Expression von Genen derart, daß eine verstärkte antimikrobielle Abwehr (Steigerung der Expression von S100A7, S100A8, S100A9), eine verminderte terminale Differenzierung (Reduktion der Expression von FLG, K1, K10, DSC1, KDAP, KLK7) und eine gesteigerte Mobilität der Zellen (Steigerung der Expression von MMP1, MMP3, Reduktion der Expression von ANXA9) daraus abzuleiten ist. Die im Detail untersuchte Wirkung von IL-22 auf die Genexpression von S100A7, CALML5 und MMP1 war zeitabhängig und dosisabhängig reguliert und unabhängig vom Differenzierungszustand der Keratinozyten. Während IL-22 auf die Expression von S100A7 und CALML5 einen direkten Effekt ausübte, wurde für die Regulation der Expression von MMP1 eine indirekte Wirkung von IL-22, welche durch ein endogenes, klassisch sezerniertes Protein vermittelt wird, das wahrscheinlich einen Liganden der EGF-Rezeptor-Familie darstellt, nachgewiesen. Interessanterweise wirkte IL-22 auf die Regulation der Expression von S100A7, CALML5 und MMP1 in Synergie mit IL-1 $\beta$ . Die Induktion der Expression von S100A8, S100A9 und MMP1 in der Haut durch IL-22 wurde *in vivo* in Mäusen bestätigt. In Hepatozyten bewirkte IL-22 eine Induktion des LPS-Bindungsproteins (LBP), welches in hohen Konzentrationen LPS neutralisiert und somit dessen immunstimulatorische Aktivität hemmt. Der Effekt von IL-22 auf die LBP-Produktion war transkriptionell reguliert und synergistisch mit dem von bekannten LBP-Induktoren wie IL-6. *In vivo* zeigte sich, daß eine IL-22-Gabe in der Maus die Expression von LBP in der Leber, nicht jedoch in der Lunge oder Niere induzierte und zu erhöhten systemischen LBP-Spiegeln führte. Entsprechend der nachgewiesenen Anwesenheit von IL-22 fanden sich bei Psoriasis die Keratinozyten-spezifischen, neu identifizierten IL-22-Wirkungen in der läsionalen psoriatischen Haut wieder. Auch bei Morbus-Crohn-Patienten wurde die Hepatozyten-spezifische, neu identifizierte IL-22-Wirkung nachgewiesen.

Um die **Rolle von IL-22BP** bei der Regulation der IL-22-Aktivität näher zu beleuchten, wurde dessen Affinität zu IL-22 mittels Oberflächenplasmonresonanztechnik untersucht. Dies zeigte, daß IL-22BP eine ca. 10-fach höhere Affinität zu IL-22 als der zelloberflächenständige Rezeptor IL-22R1 aufweist und somit einen hochaffinen IL-22-



Inhibitor darstellt. Dies konnte durch eine IL-22BP-bedingte Verminderung der IL-22-induzierten LBP-Produktion in Hepatozyten bestätigt werden. Die Analyse der Expression von IL-22BP zeigte weiter, daß dieses in der läsionalen psoriatischen Haut gegenüber der Haut gesunder Kontrollprobanden, sowie im Kolon bei Mäusen mit DSS-induzierter Kolitis gegenüber Kontrolltieren, nicht jedoch in den drainierenden Lymphknoten dieser Tiere stark vermindert war. Das lässt vermuten, daß die Regulation der IL-22BP-Expression einen wichtigen Mechanismus der Regulation der IL-22-Aktivität darstellt.

Die biologische Rolle von IL-22 scheint somit vornehmlich: a) in seiner protektiven und regenerativen Wirkung auf Gewebezellen und b) auf seiner induzierenden Wirkung bezüglich Effektormechanismen der angeborenen Immunabwehr zu liegen, deren Signifikanz sich bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen zeigt. Bei der Psoriasis steht neben der gesteigerten antimikrobiellen Abwehr vor allem der regenerative Phänotyp der Keratinozyten, welcher durch eine verminderte terminale Differenzierung und eine gesteigerte Mobilität gekennzeichnet ist, im Vordergrund und bildet die Ursache für die klinisch sichtbaren Hautveränderungen bei dieser Erkrankung. Demgegenüber könnte bei Morbus Crohn IL-22 durch die Induktion von hepatozytärem LBP zur Neutralisierung von durch die gestörte Darmbarriere ins Blut translozierte bakterielle LPS zur lokalen Begrenzung der Entzündung beitragen. Ausgehend von diesen Beobachtungen wäre eine IL-22-Neutralisierung bzw. IL-22-Applikation ein innovativer Therapieansatz für die Behandlung der Psoriasis bzw. des Morbus Crohn.

## 1 EINLEITUNG

### 1.1 Zytokine

Zytokine sind lösliche Mediatoren, welche der koordinierten interzellulären Kommunikation dienen. Sie regulieren eine Vielzahl biologischer Funktionen wie Inflammation und Immunabwehr, Wachstum und Differenzierung von Zellen, Hematopoiese, Angiogenese und Wundheilung. Zytokine sind kleine aus 60 bis 200 Aminosäuren (AS) aufgebaute, sezernierte und teilweise glykosylierte Polypeptide. Die Bildung von Zytokinen erfolgt vor allem nach zellulärer Stimulation beispielsweise durch Antigene, Mikroben, mikrobielle Bestandteile oder andere Zytokine. Dabei ist die Produktion der Zytokine transient und wird durch vielfältige Mechanismen limitiert. Dazu zählen die Destabilisierung der mRNA durch sogenannte Destabilisierungssequenzen, welche viele Zytokin-Transkripte tragen, sowie die Induktion einer negativen Rückkopplung durch die Blockierung der mRNA-Expression durch negativ regulatorische Promotor-bindende Elemente. Während einige Zytokine von einer eher begrenzten Anzahl von Zelltypen gebildet werden, gibt es auch solche, welche von nahezu jeder kernhaltigen Zelle produziert werden. Ihre Wirkung entfalten Zytokine durch Bindung an zelloberflächenständige Zytokinrezeptoren. So sind Zielzellen durch das Vorhandensein der spezifischen Rezeptoren auf der Zelloberfläche gekennzeichnet. Zytokinrezeptoren sind transmembranäre Proteine, welche das Zytokin-Bindungssignal durch die Initiation einer Signaltransduktion ins Zellinnere weiterleiten. Dies führt über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zur Modulation der Genexpression und somit beispielsweise durch Regulation von Proliferation, Differenzierung oder Apoptose zu einer Veränderung des funktionellen Zustandes der Zelle, sowie zur Produktion löslicher Mediatoren. Zytokine können zum Einen auf die Zelle, die diese produzieren (autokrin), auf benachbarte Zellen (parakrin) oder auf entfernt gelegene Zellen wirken (endokrin) und somit lokale wie systemische Wirkungen entfalten. Während einige Zytokine verschiedene Effekte auf unterschiedliche Zielzellen haben (Pleiotropie), gibt es Zytokine, welche gleiche Effekte auf eine gemeinsame Zielzelle ausüben (Redundanz). Verschiedene Zytokine wirken oft zeitgleich zusammen, was zu einer gegenseitigen Verstärkung der Effekte führen kann und als Synergie bezeichnet wird. Auch die Wirkung von Zytokinen unterliegt einer negativen Regulation. Diese kann zum einen durch eine verminderte Rezeptorbindung, beispielsweise durch Hemmung der Rezeptorexpression, Abspaltung der Rezeptoren von der Zelloberfläche („Rezeptorshedding“) oder die Expression von signaltransduktionsinkompetenten, sogenannten „Decoy-Rezeptoren“ und zum anderen durch die Hemmung der Signaltransduktion durch die Aktivierung von Phosphatasen oder „suppressor of cytokine signaling“ (SOCS) genannte Signaltransduktionsinhibitoren erfolgen.

Zytokine lassen sich entsprechend unterschiedlicher Kriterien systematisch in Gruppen einteilen. Eine sehr frühe Einteilung der Zytokine erfolgte basierend auf deren Produzenten und Zielzellen. So wurden beispielsweise durch Lymphozyten und Monozyten produzierte Zytokine als Lymphokine bzw. Monokine bezeichnet, und die Interleukine stellen per Konvention eine Gruppe von Mediatoren dar, welche sowohl von Leukozyten produziert werden, als auch auf diese Zellen wirken. Diese Zuordnung ist in vielen Fällen heute jedoch nicht mehr eindeutig.

Eine andere Einteilung der Zytokine beruht auf deren biologischer Wirkung. Hier werden Zytokine unterschieden, welche eine Funktion bei der antiviralen Abwehr haben (Interferone), die Chemotaxis von Zellen induzieren (Chemokine) oder als Wachstumsfaktoren hematopoietischer (Kolonie-stimulierende Faktoren) und lymphoider Zellen (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9) fungieren. Weiterhin werden nach ihrer Rolle bei der Immunantwort entzündungsfördernde (proinflammatorische) und immunstimulatorische [Tumornekrosefaktor(TNF)- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6] gegenüber entzündungshemmenden (antiinflammatorischen) und immunsuppressiven Zytokine [IL-10 oder Transforming Growth Factor(TGF)- $\beta$ ] unterschieden. Eine Einteilung erfolgt auch nach ihrer Funktion als Mediatoren der angeborenen Immunabwehr (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , Typ I Interferone) und der adaptiven Immunabwehr (IL-2, IL-4, IL-21).

Neben der Gruppierung von Zytokinen gemäß ihrer Produzenten und Zielzellen oder ihrer biologischen Wirkung, werden Zytokine auch nach der Struktur bzw. der Struktur ihrer Rezeptoren systematisch in Familien eingeteilt. Hier werden hauptsächlich Typ-I-Zytokine, die IL-10–Interferon-Familie (Typ-II-Zytokine), die IL-1-Familie, die TNF-Familie, die TGF-Familie, die IL-17-Familie und die Chemokine unterschieden. Während die Typ-I-Zytokine (Hämatopoietine) aus 4 gebündelten  $\alpha$ -Helices aufgebaut sind und an Rezeptoren der Zytokinrezeptor-Familie der Klasse 1 (CRF1) binden [1], bestehen Mitglieder der IL-10–Interferon-Familie aus sechs oder sieben  $\alpha$ -Helices in einer Bündel-ähnlichen Anordnung und nutzen Rezeptoren der Zytokinrezeptor-Familie der Klasse 2 (CRF2) [2]. Zu den Typ-I-Zytokinen zählen Zytokine, welche die IL-2R $\gamma$ -Rezeptorkette nutzen (IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15, IL-21), Zytokine, welche die CSF2R $\beta$ -Kette nutzen (IL-3, IL-5, GM-CSF), Zytokine, welche homodimere Rezeptoren nutzen (IL-13, SCF, G-CSF, M-CSF), solche welche die gp130 Kette nutzen (IL-6, IL-11, Oncostatin M, LIF) sowie die Zytokine der IL-12-Familie (IL-12, IL-23, IL-27, IL-35). Die IL-10–Interferon-Familie umfasst die Typ-I- und Typ-II-Interferone [Interferon(IFN)- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\epsilon$ , IFN- $\kappa$ , IFN- $\omega$ , IFN- $\delta$ , IFN- $\gamma$ , sowie die Mitglieder der IL-10-Familie (IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28 $\alpha$ , IL-28 $\beta$ , IL-29). Die IL-1-Familie umfasst die über heterodimere Rezeptoren der Immunglobulin (Ig)-Superfamilie wirkenden Zytokine IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1RA), IL-18, IL-1F5, IL-1F6, IL-1F7, IL-1F8, IL-1F9 und IL-1F10 [3]. Die TNF-Familie, zu der neben

vielen weiteren Mitgliedern die Zytokine TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  und LT $\beta$  zählen, nutzt homotrimere Rezeptoren der TNF-Rezeptorfamilie [4]. Zur TGF-Familie zählen die Zytokine TGF $\beta$ 1, TGF $\beta$ 2, TGF $\beta$ 3, TGF $\beta$ 4 und TGF $\beta$ 5, welche an Rezeptoren der TGF-Rezeptorfamilie binden [5]. Die IL-17-Familie umfasst die an heterodimere Rezeptoren der IL-17-Rezeptor-Familie bindenden Zytokine IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E und IL-17F [6]. Chemokine sind eine Gruppe sehr kleiner, chemotaktisch wirksamer Zytokine, welche über G-Protein-gekoppelte, 7 transmembranäre Domänen umfassende Rezeptoren wirken [7]. Sie besitzen eine aus drei antiparallelen  $\beta$ -Blättern aufgebaute Struktur, wobei die N-terminale Anzahl und Position von Cysteinresten eine weitere systematische Unterteilung in Chemokine der CC-, CXC-, CX3C-, und C-Familie erlaubt.

Das Zytokinnetzwerk als ein normalerweise temporär und lokal fein reguliertes System, welches bei einer Vielzahl von Prozessen massive Bedeutung hat, trägt letztendlich zur Aufrechterhaltung der Homöostase des Körpers bei. Dagegen kann eine Defizienz oder Überproduktion von Zytokinen pathologische Konsequenzen haben. Entsprechend ist die Kenntnis der biologischen Rolle der einzelnen Zytokine bedeutend für eine mögliche agonistische (Gabe des Zytokins) oder antagonistische (Gabe von Zytokin-Antagonisten zur Neutralisierung des Zytokins) therapeutische Intervention bei infektiösen Erkrankungen, Tumoren oder Autoimmunerkrankungen. So entstanden aus dieser Kenntnis zahlreiche innovative Therapien, welche beispielsweise die IFN-Therapie zur Behandlung von Multipler Sklerose (IFN- $\beta$ ), Hepatitis C und diverser Tumorerkrankungen (IFN- $\alpha$ ), oder die Anti-TNF- $\alpha$ -Therapie für die Behandlung von Psoriasis, Rheumatoider Arthritis und Morbus Crohn einschließen.

## 1.2 Die IL-10–Interferon-Familie

Wie in Kapitel 1.1. erwähnt, vereint die IL-10-Interferon-Familie die lange bekannten Typ-I-Interferone (IFN- $\alpha$ , IFN- $\beta$ , IFN- $\delta$ , IFN- $\epsilon$ , IFN- $\kappa$  und IFN- $\omega$ ), das Typ-II-Interferon IFN- $\gamma$ , IL-10, sowie die IL-10-ähnlichen Zytokine IL-19, IL-20, IL-22, IL-24, IL-26, IL-28 $\alpha$ , IL-28 $\beta$  und IL-29.

Die Gene der IL-10–Interferon-Familienmitglieder liegen im humanen Genom auf vier Chromosomenabschnitten vor [2]. Während die Gene der Typ-I-Interferone in einem Cluster auf Chromosom 9p21 lokalisiert sind, befindet sich *IFNG* zusammen mit *IL22* und *IL26* auf Chromosom 12q15. Die IL-10-, IL-19-, IL-20- und IL-24-kodierenden Gene sind auf Chromosom 1q32 lokalisiert. Einen vierten Cluster bilden die Gene für IL-28 $\alpha$ , IL-28 $\beta$  und IL-29, welche sich auf Chromosom 19q13 befinden. Neben der genomischen Lokalisation ihrer Gene, weisen die Mitglieder der IL-10–Interferon-Familie innerhalb der

Unterfamilien auch Gemeinsamkeiten in der Genstruktur auf. So sind die Gene der Typ-I-Interferone durch das Fehlen von Introns gekennzeichnet [8]. Hingegen weisen die Gene von IFN- $\gamma$  und der Mitglieder der IL-10-Familie eine typische Intron-Exon-Struktur auf, welche 4 (IFN- $\gamma$ ), 5 (IL-10, IL-19, IL-20, IL-22, IL-26, 29) oder 6 (IL-24, IL-28 $\alpha$ , IL-28 $\beta$ ) Protein-kodierende Exons beinhaltet [9, 10]. Die resultierenden reifen Proteine weisen Längen von 138 bis 195 AS auf. In ihrer Primärsequenz besitzen die Mitglieder der IL-10-Interferon-Familie nur eine sehr begrenzte Identität von 13-25% zueinander, weisen jedoch durch das Vorhandensein konservierter Cysteine eine allen gemeinsame Bündel-ähnliche Struktur auf [2]. Während die biologisch aktiven Formen der IFN- $\alpha$ -Spezies, von IL-19, IL-20, IL-22, IL-28 $\alpha$ , IL-28 $\beta$ , IL-29 und wahrscheinlich auch von IL-24 Monomere sind, bilden IFN- $\beta$ , IL-10 und IL-26 eine dimere und IFN- $\gamma$  eine tetramere Struktur aus [11, 12, 13, 14, 15, 16].

Die Mitglieder der IL-10-Interferon-Familie nutzen Rezeptoren der CRF2 [2]. Dabei bestehen funktionelle Rezeptoren jeweils aus einer längeren R1- und einer kürzeren R2-Rezeptorkette. Eine Besonderheit unter den IL-10-Interferon-Familienmitgliedern ist die gemeinsame Nutzung von Rezeptorketten oder ganzen Rezeptorkomplexen. Die IL-10R2-Rezeptorkette ist beispielsweise Teil der Rezeptoren für IL-10, IL-22, IL-26, IL-28 $\alpha$ , IL-28 $\beta$  und IL-29 [17]. Weiterhin bildet ein Komplex aus den Ketten IL-20R1 und IL-20R2 den Rezeptor für IL-19, IL-20 und IL-24, wobei IL-20 und IL-24 auch an einen zweiten Rezeptor bestehend aus den Rezeptorketten IL-22R1 und IL-20R2 binden können [18, 19]. Dagegen besteht der Rezeptor für alle Typ-I-Interferone aus den Rezeptorketten IFN- $\alpha$ R1 und IFN- $\alpha$ R2c [20]. Ähnlich wie die Gene ihrer Liganden liegen die Gene der Mitglieder der CRF2 im humanen Genom in Gruppen vor und weisen eine ähnliche Genstruktur auf [2]. Die resultierenden Proteine sind aus einer extrazellulären, einer transmembranären und einer in ihrer Länge variierenden intrazellulären Domäne aufgebaut [21]. Die stark konservierte, zumeist ca. 210 AS umfassende extrazelluläre Domäne besteht aus zwei charakteristischen Fibronectin-Typ-III-Domänen (D1, D2) und ist im Vergleich zur CRF1 durch das Fehlen des Sequenzmotives W-S-X-W-S in der Nähe des C-terminalen Endes (D2) gekennzeichnet [21]. Eine Ausnahme bildet die extrazelluläre Domäne von IFN- $\alpha$ R1, welche aus vier Fibronectin-Typ-III-Domänen (D1-D4) aufgebaut ist. Aufgrund konservierter spezifischer AS bildet die extrazelluläre Domäne eine Struktur aus zwei  $\beta$ -Faltblättern mit jeweils sieben antiparallelen  $\beta$ -Blättern und konservierten Schleifen („Loops“), welche maßgeblich für die Ligandenbindung verantwortlich sind (L2, L3, L4, L5, L6), aus. Die intrazelluläre Domäne der Mitglieder der CRF2 ist weniger konserviert. Die R1-Rezeptorketten weisen im Vergleich zu den R2-Rezeptorketten längere intrazelluläre Domänen auf, welche Bindungsstellen für Signaltransduktionsmoleküle beinhalten. Während eine der beiden Rezeptorketten eines

Komplexes zur initialen Ligandenbindung befähigt ist, fungiert die andere Rezeptorkette meist als akzessorische Kette. Für IL-10 und IL-22 wurde gezeigt, daß diese Zytokine primär an ihre jeweilige R1-Rezeptorkette (IL-10R1, IL-22R1) binden, was eine nachfolgende Bindung der R2-Rezeptorkette (IL-10R2) und damit die Vervollständigung des ternären Komplexes ermöglicht [22, 23, 24, 25, 26, 27]. Hierbei wird die Bindung der IL-10R2-Rezeptorkette wahrscheinlich durch eine Konformationsänderung der Zytokine ermöglicht, welche durch die initiale R1-Rezeptorketten-Bindung induziert wird. Interessanterweise kann bei einigen Zytokinen (IL-19, IL-20) auch die R2-Rezeptorkette als primäre Ligand-bindende Kette fungieren [16].

Die IL-10–Interferon-Familienmitglieder üben ihre Effekte hauptsächlich durch Aktivierung von Janus-Kinasen (Jak) und Signaltransduktoren und Aktivatoren der Transkription (STATs) über den sogenannten Jak-STAT-Signalweg aus [2]. Durch die Bindung des Zytokins an seinen Rezeptor und der damit verbundenen Aggregation des Rezeptorkomplexes gelangen Tyrosinkinasen der Janus-Familie, die mit den intrazellulären Domänen der Rezeptorketten assoziiert vorliegen, in räumliche Nähe. Dies bewirkt eine eigenständige (Autophosphorylierung) und gegenseitige (Transphosphorylierung) Aktivierung der Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinasen. Die so aktivierten Tyrosinkinasen phosphorylieren daraufhin spezifische, innerhalb des Sequenzmotives Y-X-X-Q befindliche Tyrosinreste der intrazellulären Domäne der jeweiligen R1-Rezeptorkette, welche nach Phosphorylierung Bindungsstellen für STAT-Moleküle darstellen. Gebundene STAT-Moleküle werden daraufhin von den aktivierten Tyrosinkinasen phosphoryliert, was zu einer Homo- oder Heterodimerisierung durch die Interaktion des spezifisch phosphorylierten Tyrosins eines STAT-Moleküls mit der „Src homology 2“ (SH2)-Domäne des anderen STAT-Moleküls führt und sie dazu befähigt, in den Kern einzudringen und durch Bindung an STAT-responsive Promotoren die Transkription der Zielgene zu regulieren.

Trotz der Zuordnung zu einer gemeinsamen Zytokin-Familie unterscheiden sich die Mitglieder der IL-10–Interferon-Familie hinsichtlich ihrer biologischen Rolle.

Die Interferone wurden bereits 1957 entdeckt und wurden aufgrund ihrer Fähigkeit, mit der Replikation von Viren zu interferieren, benannt [28]. Die Bildung der Typ-I-Interferone wird vornehmlich durch Virusinfektion und Toll-like Rezeptor (TLR)-Stimulation in nahezu allen Zelltypen induziert [29]. Vor allem virale Hüllglykoproteine, CpG-DNA oder doppelsträngige RNA führen durch die Bindung an sogenannte „Pattern Recognition Rezeptoren“ wie Mannose-Rezeptoren, TLR und zytosolische Rezeptoren zu einer Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie IRF („interferon regulatory factor“) -3, -5, und -7, AP-1 („activating protein 1“) und NF- $\kappa$ B („nuclear factor kappa B“), welche die Transkription der Typ-I-Interferone induzieren. Die Produktion des Typ-II-Interferons IFN- $\gamma$

hingegen ist auf aktivierte T-, NK- und NK-T-Zellen beschränkt [30]. Wie oben beschrieben, wirken die Typ-I-Interferone über einen gemeinsamen, aus den Rezeptorketten IFN- $\alpha$ R1 und IFN- $\alpha$ R2c bestehenden Rezeptorkomplex [20]. IFN- $\gamma$  nutzt einen Rezeptor, welcher aus den Ketten IFN- $\gamma$ R1 und IFN- $\gamma$ R2 aufgebaut ist [30]. Zielzellen der Typ-I- und Typ-II-Interferone sind aufgrund der ubiquitären Expression ihrer Rezeptoren nahezu alle Körperzellen [20]. Während die Typ-I-Interferone vornehmlich eine Signaltransduktion über die Phosphorylierung von STAT1 und STAT2 induzieren, welche zusammen mit p48 (IRF 9) den Transkriptionsfaktor-Komplex ISGF3 („interferon stimulated response gene 3“) bilden, der an ISRE-Elemente („interferon stimulated response element“) in der Promotorregion von Typ-I-interferon-Zielgenen bindet, induziert das Typ-II-Interferon IFN- $\gamma$  vorwiegend eine Phosphorylierung von STAT1, was zu einer Bildung von STAT1-Dimeren führt, welche an GAS-Elemente („gamma activated sequence“) in Promotorregionen von IFN- $\gamma$ -Zielgenen bindet [20, 31, 32].

Zu den vielfältigen biologischen Wirkungen der Typ-I-Interferone zählen neben der Hemmung von Proliferation und Angiogenese vor allem die antivirale Aktivität [20]. Durch die Induktion antiviral wirkender Proteine wie RNA-aktivierte Proteinkinase, MxA-Protein und 2'5'-Oligoadenylatsynthetase bewirken die Typ-I-Interferone eine direkte Hemmung der viralen Replikation [33]. Während RNA-aktivierte Proteinkinase die Proteinsynthese hemmt und 2'5'-Oligoadenylatsynthetase die Degradation zellulärer und viraler mRNA induziert, hemmt MxA die Virusreplikation in infizierten Wirtszellen durch Interferenz mit dem intrazellulären Transport viraler Komponenten. Zu den indirekten antiviralen Wirkungen der Typ-I-Interferone zählt die Erhöhung der MHC-Klasse-I-Expression auf ihren Zielzellen [20]. Dies ist für die zytotoxische Aktivität von zytotoxischen T-Zellen gegenüber infizierten Zellen, welche virale Antigene über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentieren, entscheidend und wirkt der Eigenschaft vieler Viren entgegen, die Antigenpräsentation zu inhibieren [34].

Entgegen den Typ-I-Interferonen bewirkt IFN- $\gamma$  vor allem durch die Aktivierung von zellvermittelten Immunantworten eine Steigerung der Abwehr gegen intrazelluläre Pathogene und verstärkt antivirale und antitumorale Immunantworten [30]. Zu den Wirkungen von IFN- $\gamma$  zählt hier vor allem die Aktivierung von monozytären Zellen. IFN- $\gamma$  steigert deren Phagozytosekapazität durch seine Wirkung, auf B-Zellen die Bildung neutralisierender und opsonierender Antikörper bestimmter Isotypklassen (IgG1 und IgG3) zu induzieren, welche direkt an phagozytäre Fc-Rezeptoren binden [30]. Durch die Induktion von reaktiven Sauerstoffspezies verstärkt IFN- $\gamma$  auch die Abtötung phagozytierter Pathogene. Im weiteren bewirkt IFN- $\gamma$  eine Erhöhung der Expression von MHC-Klasse-I-, MHC-Klasse-II- und kostimulatorischen Molekülen auf seinen Zielzellen und trägt somit zu einer Steigerung der Antigenpräsentationskapazität und zu einer

Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen bei [20].

Interleukin(IL)-10 ist bereits seit 1989 bekannt [35, 36]. Es stellt eines der bedeutendsten immunregulatorischen Zytokine dar. IL-10 wird hauptsächlich durch aktivierte monozytäre Zellen, sowie auch durch T-Zellen, B-Zellen, NK-Zellen und Mastzellen produziert und nutzt einen Rezeptor bestehend aus den Rezeptorketten IL-10R1 und IL-10R2. Die biologische Rolle von IL-10 liegt vornehmlich in der temporären und lokalen Begrenzung der Immunantwort, hauptsächlich durch Effekte auf Antigen-präsentierende Zellen. IL-10 entfaltet diese antiinflammatorischen und immunsuppressiven Effekte durch die Hemmung der Produktion und Wirkung proinflammatorischer Zytokine, durch eine Verminderung der Antigenpräsentation und Kostimulation, sowie durch eine Steigerung der Phagozytosekapazität. So bewirkt IL-10 in monozytären Zellen eine Hemmung der Synthese pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, CXCL8, IL-12, IL-18 und IL-23 sowie eine Steigerung der Synthese antiinflammatorischer Mediatoren wie IL-1RA und der löslichen TNF- $\alpha$ -Rezeptoren p55 und p75 [37, 38, 39, 40, 41]. Durch die verminderte IL-12-, IL-18- und IL-23-Synthese in monozytären Zellen bewirkt IL-10 neben der direkten antiinflammatorischen Wirkung auf monozytäre Zellen auch eine Verminderung der durch diese Zytokine induzierten IFN- $\gamma$ -Produktion (IL-12, IL-18) bzw. IL-17-Produktion (IL-23) in T-Zellen und damit eine Hemmung der Entwicklung adaptiver T1- bzw. T17-Immunantworten [42]. Seine immunsuppressive Wirkung entfaltet IL-10 im Weiteren durch eine Verminderung der Antigenpräsentation und somit der T-Zell-Stimulationskapazität monozytärer Zellen durch eine Hemmung der Zelloberflächenexpression von MHC-Klasse-II-Molekülen (HLA-DR, -DQ, -DP), kostimulatorischen (CD86, CD80) Molekülen und Adhäsionsmolekülen (CD54) in diesen Zellen, sowie durch die Hemmung der Enddifferenzierung dieser Zellen in dendritische Zellen (DCs) [43, 44, 45]. Die Förderung der Phagozytose von monozytären Zellen durch IL-10 erfolgt durch eine Steigerung der Expression von Molekülen, welche für die Aufnahme von opsonierten (Fc $\gamma$ -Rezeptoren CD16, CD32 und CD64) und nicht-opsonierten [Lipopolysaccharid (LPS)-Rezeptorkomponente CD14] Erregern bedeutsam sind, sowie durch die Förderung der Enddifferenzierung dieser Zellen in Makrophagen [43, 46, 47, 48, 49]. Neben den Effekten auf monozytäre Zellen wirkt IL-10 auch direkt inhibitorisch auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Weiterhin fördert IL-10 eine Differenzierung naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen zum sogenannten regulatorischen Phänotyp, welcher sich durch eine geringe Proliferation und der selektiven Produktion von IL-10 und TGF- $\beta$ , sowie der Fähigkeit Antigen-abhängige T-Zell-Antworten zu supprimieren, auszeichnet [50, 51, 52, 53].

Das seit 2000 bekannte IL-19 liegt in zwei unterschiedlichen Transkript-Varianten vor [54]. Während die Expression eines in einem 159 AS langen Protein resultierenden Transkriptes (NCBI Eintrag NM\_013371) überwiegt, gibt es ein alternatives größeres



Expressionsprodukt (NCBI Eintrag NM\_153758), was bis *dato* nicht weiter charakterisiert wurde. Zu den Produzenten von IL-19 zählen sowohl aktivierte Monozyten als auch Gewebszellen wie primäre Keratinozyten nach Stimulation mit IL-1 $\beta$  und IL-4 [54, 55]. Weiterhin ist eine erhöhte IL-19-Expression auch mit verschiedenen entzündlichen Erkrankungen wie Psoriasis und Asthma assoziiert [55, 56]. IL-19 wirkt über einen Rezeptor, welcher aus den Rezeptorketten IL-20R1 und IL-20R2 besteht. Die biologische Rolle von IL-19 ist bislang jedoch noch völlig unverstanden.

IL-20 wurde im Jahr 2001 kloniert [57]. Zu den Produzenten von IL-20 zählen aktivierte Monozyten und reifende DCs, jedoch stellen auch Gewebszellen IL-20-Produzenten dar [58, 59]. So produzieren primäre Keratinozyten sowohl konstitutiv und verstärkt nach IL-1 $\beta$ -Stimulation große Mengen an IL-20 [55, 59]. IL-20 kann über zwei verschiedene Rezeptoren wirken, welche aus den Rezeptorketten IL-22R1 und IL-20R2 oder IL-20R1 und IL-20R2 aufgebaut sind. Aufgrund der exklusiven Expression von IL-22R1 und IL-20R1 durch Gewebszellen, insbesondere durch Keratinozyten, stellen diese Zellen wichtige Zielzellen von IL-20 dar [18, 55]. Die biologische Rolle von IL-20 scheint daher unter anderem in der Regulation von Keratinozytenfunktionen zu liegen. So wurde gezeigt, daß IL-20-transgene neugeborene Mäuse neben einer geringeren Größe und einer erhöhten neonatalen Letalität einen Hautphänotyp aufweisen, welcher mit einer Verdickung der Epidermisschicht (Akanthose) und des *Stratum corneum* (Hyperkeratose), sowie einer abnormen suprabasalen Expression der Keratine 5, 14 und 6 assoziiert ist und eine gestörte Differenzierung der Keratinozyten und eine Hyperproliferation durch IL-20 vermuten lässt [57]. Neben der Hemmung der Keratinozytendifferenzierung stärkt IL-20 durch die Steigerung der Expression von antimikrobiellen Proteinen die antimikrobielle Abwehr dieser Zellen [60]. Die Ähnlichkeit der in den IL-20-transgenen Mäusen gefundenen epidermalen Veränderungen und den *in vitro*-Effekten von IL-20 auf humane Epidermisäquivalente mit dem psoriatischem Hautbild, sowie die Verminderung der epidermalen Veränderungen in einem murinen Psoriasis-Modell durch eine Neutralisierung von IL-20 lässt eine wichtige Rolle des Zytokins bei der Pathogenese der Psoriasis vermuten [57, 60, 61]. Auch bei anderen Erkrankungen scheint IL-20 eine pathogenetische Rolle zu spielen. IL-20 wirkt proatherogen in einem murinen Artherosklerose-Modell und fördert die Expression von MCP-1, IL-6 und CXCL8 in synovialen Fibroblasten von Patienten mit Rheumatoider Arthritis *in vitro* [62, 63]. Zu den weiteren beschriebenen Effekten von IL-20 zählt die proangiogenetische Wirkung auf Endothelzellen und die Induktion von Apoptose in Nierenepithelzellen [63, 64, 65, 66, 67]. IL-22 wurde erstmalig als ein von IL-9-stimulierten T-Zellen differentiell exprimiertes Zytokin mit Ähnlichkeit zum IL-10 beschrieben [68, 69]. IL-22 wird vorwiegend von aktivierten T-Zellen und aktivierten NK-Zellen gebildet und nutzt einen Rezeptor, welcher

aus den Rezeptorketten IL-22R1 und IL-10R2 besteht [58, 70, 71]. IL-22 scheint einen Mediator darzustellen, welcher vor allem auf Gewebe äußerer Grenzschichten wirkt und hier die angeborene Immunabwehr steigert und regenerative und protektive Wirkungen entfaltet. Auf seine Rolle wird speziell in Kapitel 1.3.4 eingegangen.

IL-24 wurde bereits 1995 beschrieben [72, 73, 74, 75]. IL-24 wird sowohl von Gewebszellen, wie Melanozyten und primären Keratinozyten, als auch von Immunzellen, insbesondere aktivierten Monozyten und T-Zellen, exprimiert [55, 58, 72]. Wie IL-20 nutzt IL-24 zwei verschiedene Rezeptorkomplexe bestehend aus den Rezeptorketten IL-22R1/IL-20R2 und IL-20R1/IL-20R2 und hat somit identische Zielzellen, zu denen ausschließlich Gewebszellen zählen [18, 55]. Zu den bedeutendsten Effekten von IL-24 zählt die antiproliferative und Apoptose-induzierende Wirkung spezifisch auf Tumorzellen [76, 77]. Die Antitumoraktivität von IL-24 scheint dabei auf zwei Wirkmechanismen zu basieren. Intrazelluläres, mittels adenoviralem Gentransfer exprimiertes IL-24 induziert eine Tumorzell-spezifische Apoptose durch eine Stressantwort des Endoplasmatischen Retikulum. Von diesen Zellen sezerniertes IL-24 induziert Apoptose in benachbarten, nichttransfizierten Zellen, jedoch nicht in normalen Zellen und bewirkt eine Stabilisierung der eigenen mRNA, was eine positive Verstärkung der eigenen Wirkung zur Folge hat [78]. Weiterhin erhöht IL-24 die Sensitivität von Tumorzellen gegenüber Bestrahlung, Chemotherapie und Antikörper-basierter Therapie. Diese Ergebnisse führten bereits zu einer ersten erfolgreichen klinischen Erprobung von IL-24 als Anti-Tumorthapeutikum (INGN 241) in klinischen Studien (Phase I und II) in Patienten mit metastasierendem Melanom und anderen soliden Tumoren [79]. Neben der Anti-Tumor-Aktivität bewirkt IL-24 auch eine Steigerung der angeborenen Immunabwehr durch die Induktion der Expression von antimikrobiellen Proteinen [60].

IL-26 wurde bei der Suche nach differentiell exprimierten Genen in *Herpesvirus saimiri* (HVS)–transformierten T-Zellen mittels subtraktiver suppressiver Hybridisierung identifiziert [80]. Ähnlich wie IL-22 wird IL-26 von aktivierten T-Zellen insbesondere T-Helfer(Th)1- und Th17-Zellen und aktivierten NK-Zellen gebildet, während Gewebszellen keine IL-26-Produzenten darstellen [55, 58, 81]. Der Rezeptor für IL-26 besteht aus den Rezeptorketten IL-20R1 und IL-10R2, wobei beide Rezeptorketten nur auf Gewebszellen koexprimiert sind, was Immunzellen als Zielzellen von IL-26 ausschließt [12, 55, 82]. Die biologische Funktion von IL-26 ist bis *dato* unverstanden. Zu den bislang bekannten Effekten von IL-26 zählt die Induktion von CXCL8 in Kolonkarzinomzellen (Colo-205, Lovo) und kolorektalen Adenokarzinomzellen (HT29) [12, 83]. Weiterhin wurde auch eine vermehrte Synthese von TNF- $\alpha$  und IL-10 in HT-29- bzw. Colo-205-Zellen beschrieben [12, 83]. In Zellen der Keratinozytenzelllinie HaCaT induziert IL-26 die Expression von CXCL8 und die Zelloberflächenexpression von ICAM-1 [12].

Auf der Suche nach weiteren Zytokinen wurden im Jahr 2003 die jüngsten Mitglieder der IL-10–Interferon-Familie, IL-28 $\alpha$ , IL-28 $\beta$  und IL-29, welche auch als Interferon- $\lambda$ 2, - $\lambda$ 3 und - $\lambda$ 1 bezeichnet werden, unabhängig von zwei Forschergruppen beschrieben [84, 85]. Die orthologen Zytokine wurden kurze Zeit später auch im murinen System identifiziert [86], wobei das murine *il29*-Gen keine Sequenz für ein intaktes Protein beinhaltet. Hinsichtlich der Aminosäuresequenz sind IL-28 $\alpha$  und IL-28 $\beta$  zu 96% und IL-28 $\alpha$  und IL-29 zu 81% identisch, was eine starke Redundanz des Wirkungsspektrums vermuten lässt [85]. IL-28 $\alpha/\beta$  und IL-29 können nach viraler Infektion oder durch Agentien, welche eine virale Infektion imitieren, wie Polyinosin-Polycytidinsäure durch fast jede kernhaltige Zelle gebildet werden, insbesondere jedoch von infizierten oder LPS-stimulierten plasmazytoiden DCs [84, 87, 88]. Jedoch auch Monozyten und reife DCs stellen Produzenten dieser Zytokine dar [59]. Der Rezeptor für IL-28 $\alpha$ , IL-28 $\beta$  und IL-29 besteht aus den Rezeptorketten IL-28R1 und IL-10R2 [84, 85]. IL-28R1 wird entgegen der ubiquitären Expression von IL-10R2 gewebespezifisch exprimiert [84, 85]. IL-28 $\alpha$ , IL-28 $\beta$  und IL-29 wirken auf ihre Zielzellen durch eine sowohl Typ-I-Interferon-ähnliche, als auch den IL-10-ähnlichen Zytokinen-ähnliche Signaltransduktion mit Bildung des Transkriptionsfaktor-Komplexes ISGF3 sowie Aktivierung von STAT3 und STAT5 [59, 84, 85]. Zu den biologischen Effekten von IL-28 $\alpha$ , IL-28 $\beta$  und IL-29 zählen insbesondere Typ-I-Interferon-ähnliche direkte und indirekte antivirale Wirkungen [84, 89, 90, 91]. Neben diesen Effekten konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, daß IL-29 und wahrscheinlich auch IL-28 $\alpha$  und IL-28 $\beta$  eine Steigerung der angeborenen Immunabwehr durch Induktion der Expression von TLR2 und TLR3 in primären Keratinozyten sowie in Synergie mit IL-20 eine Steigerung der Expression von antimikrobiellen Proteinen, CXCL8 und TNF- $\alpha$  nach Stimulation dieser TLRs bewirkt [59].

### 1.3 IL-22 – ein Mitglied der IL-10–Interferon-Familie

#### 1.3.1 Genstruktur und Proteinstruktur von IL-22

IL-22 wurde im Jahr 2000 zunächst im murinen System identifiziert [68]. Murines IL-22 wurde als ein in IL-9-stimulierten BW5147-T-Lymphoblasten differentiell exprimiertes Gen identifiziert, was zu der initialen Bezeichnung als „IL-TIF“ (IL-10 related T cell derived inducible factor) führte.

In der Maus wurden 2 orthologe Gene identifiziert, *iltifa* und *iltifb*. Eine Expression von IL-TIF $\beta$ , welches im Vergleich zu IL-TIF $\alpha$  eine Deletion beinhaltet, konnte jedoch bis *dato* nicht nachgewiesen werden. Das murine *il22*-Gen (NCBI Eintrag NT\_049045) ist auf

Chromosom 10D2 ähnlich wie im humanen System in der Nähe des Gens für IFN- $\gamma$  lokalisiert. Humanes IL-22 wurde kurze Zeit später und etwa zeitgleich durch zwei Forschergruppen identifiziert [69, 71]. Das humane *IL22*-Gen (NCBI Eintrag NT\_029419) beinhaltet 5 Exons mit einem offenen Leserahmen von 537 Bp ohne Stop-Codon [92]. Das Exon 1 umfasst 239 Bp, von denen die ersten 54 Bp die 5' untranslatierte Region bilden. Der Rest (186 Bp) von Exon 1, Exon 2 bis 4, sowie der erste Teil (78 Bp) von Exon 5 enthalten die Protein-kodierende Sequenz. Im Weiteren betragen die Längen von Exon 2: 66 Bp, von Exon 3: 144 Bp und von Exon 4: 66 Bp. Exon 5 umfasst 632 Bp, von denen die letzten 553 Bp die 3' untranslatierte Region bilden. Diese enthält neben dem Polyadenylierungssignal ähnlich dem *IL10*-Gen mehrere Kopien der Sequenz ATTTA, die an der Regulation der mRNA-Stabilität beteiligt ist [92]. Die resultierenden humanen (NCBI Referenzsequenz NP\_065386) und murinen Proteine (NCBI Referenzsequenz NP\_058667) haben eine Länge von 179 AS mit einer vorhergesagten Signalsequenz von 33 AS, so daß nach deren Abspaltung die reifen sezernierten Proteine jeweils 146 AS umfassen, deren Sequenzidentität zueinander 79% beträgt [92]. Humanes IL-22 ist dagegen nur zu 24,7% in seiner Aminosäuresequenz identisch zu IL-10. Trotz dieser relativ geringen Primärsequenzidentität besitzt IL-22 eine IL-10-ähnliche Struktur. Durch Kristallstrukturanalyse konnte gezeigt werden, daß IL-22 eine aus 6 antiparallelen  $\alpha$ -Helices (Helix A-F) gebildete alpha-helikale Bündel-ähnliche Struktur besitzt. Diese wird durch 4 spezifische strukturgebende Cysteinreste, von denen die ersten 3 auch in der IL-10-Aminosäuresequenz zu finden sind und zur Bildung zweier Disulfidbrücken führen, welche den N-Terminus mit dem DE-Loop (Cys40-Cys132) und Helix C mit Helix F (Cys89-Cys178) verbinden, ausgebildet [93]. Im Gegensatz zum dimeren IL-10-Molekül, welches eine aus 2 identischen interkalierenden Monomeren bestehende V-förmige Struktur aufweist, zeigte die Kristallstrukturanalyse eine monomere Struktur für IL-22 [14, 94]. Eine kürzlich erschienene Arbeit zeigte jedoch, daß zumindest bei sehr hohen Konzentrationen (mg/ml) eine Ausbildung von aktiven IL-22-Dimeren und inaktiven IL-22-Tetrameren möglich ist, welche möglicherweise einen Pool für aktive Monomere darstellen [95]. IL-22 hat 3 potentielle N-Glykosylierungsstellen, gekennzeichnet durch das Sequenzmotif N-X-S/T, an den Asparaginresten N54, N68 und N97 [14]. Eine Expression von IL-22 in glykosylierungskompetenten S2 *Drosophila melanogaster* Zellen zeigte, daß das Protein mit allen 3 N-Glykosylierungen die häufigste Form darstellt. Hierbei scheint die N-Glykosylierung von N54 für die Bindung von IL-22 an die IL-10R2-Rezeptorkette besonders bedeutsam zu sein [96].

### 1.3.2 Zelluläre Quellen von IL-22

Mit der Identifizierung des murinen IL-22 wurde dessen Expression initial in IL-9-stimulierten murinen BW5147-Lymphoblasten und Zellen des T-Helfer-Klons TS2, in IL-9-stimulierten MC9-Mastzellen, sowie in Concavalin A (ConA)-stimulierten Milzzellen beschrieben [68]. Die Expression des humanen IL-22 wurde in einer ersten Arbeit in mittels Anti-CD3 Antikörper (Ak) stimulierten und insbesondere in mittels Anti-CD3-Ak und ConA kostimulierten humanen T-Zellen nachgewiesen [71]. Neben stimulierten T-Zellen stellen auch NK-Zellen, insbesondere nach Stimulation mit IL-2 und IL-12 zelluläre Quellen von IL-22 dar [58]. Aktivierte NK-Zellen und möglicherweise auch aktivierte NKT-Zellen könnten für die *in vivo* nach intraperitonealer (i.p.) Gabe des mikrobiellen Bestandteils LPS in verschiedenen Organen des Respirations- und Gastrointestinalsystems (Lunge, Magen, Leber Darm), sowie in Niere, Milz, Herz, Lymphknoten und Haut beschriebene massive IL-22-Expression verantwortlich sein [27, 55, 68, 69].

Im Jahr 2002 konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, daß unter den T-Zellen IL-22 vor allem von CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert wird, welche einen durch das Vorhandensein der zelloberflächenständigen CD45RO-Isoform gekennzeichneten Gedächtniszell-Phänotyp aufweisen. Hinsichtlich naiver CD4<sup>+</sup> T-Zellen ist die Expression von IL-22 abhängig von einer Kostimulation *via* CD28 [58]. Initiale Arbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigten, daß vor allem Th1-Zellen massiv IL-22 exprimieren [58]. Neuere Publikationen demonstrierten, daß IL-22 neben der bekannten präferentiellen Expression durch Th1-Zellen auch sehr stark durch Th17- und Th22-Zellen, erst kürzlich identifizierten T-Helferzellpopulationen, exprimiert wird [97]. Th17-Zellen zeichnen sich durch die Expression des Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ t, welcher eine essentielle Rolle bei der Th17-Differenzierung spielt, durch eine verstärkte Expression des IL-23-Rezeptors, sowie durch die Expression der Zytokine IL-17A und IL-17F aus [98]. Eine klare mRNA- und Protein-Expression von IL-22 wurde durch murine und humane naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach einer *in vitro*-Polarisierung zum Th17-Phänotyp mittels unterschiedlicher Differenzierungsprotokolle gezeigt [97, 99, 100]. Während jedoch im murinen System Th17-Zellen als die wichtigste IL-22-produzierende T-Helferzellpopulation beschrieben wurde, spielen im humanen System die Th1-Zellen wahrscheinlich eine weit wichtigere Rolle als IL-22-Produzenten [101]. Möglicherweise beruhen diese Spezies-spezifischen Unterschiede auf der unterschiedlichen Wirkung der für die Th17-Differenzierung notwendigen Zytokine im humanen (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23, TGF $\beta$ ) und murinen System (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-21, IL-23, TGF $\beta$ ) auf die IL-22-Expression. So scheinen IL-21 und IL-23 essentiell, IL-1 $\beta$  und IL-6 unbedeutend und TGF $\beta$  inhibitorisch für die Expression von IL-22 durch murine T-Zellen zu sein. Hingegen ist im humanen System die Anwesenheit von IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-23

notwendig [42, 81, 97, 100]. Umstritten ist derzeit noch die Rolle von TGF $\beta$  für die Expression von IL-22 durch humane Th17-Zellen [81, 101].

Im Gegensatz zu Th1- und Th17-Zellen sind die erst in diesem Jahr entdeckten Th22-Zellen nicht durch Koproduktion anderer Th-prototypischer Zytokine wie IFN- $\gamma$ , IL-4 oder IL-17A gekennzeichnet [102, 103, 104]. Dagegen produzieren sie neben IL-22 vornehmlich TNF- $\alpha$  und Fibroblasten-Wachstumsfaktoren. Sie zeigen ein spezielles Chemokinrezeptorprofil (CCR4, CCR6, CCR10) und eine Expression der Transkriptionsfaktoren Arylhydrocarbonrezeptor (AHR), BNC2 und FOXO4, entstehen vermutlich insbesondere durch die Interaktion mit plasmazytoiden DCs bei Anwesenheit von TNF- $\alpha$  und IL-6 und regulieren die epidermale Homöostase und Regeneration [102, 103, 104]. Neben der Produktion durch  $\alpha\beta$  T-Zellen wurde eine IL-22-Produktion auch durch murine  $\gamma\delta$  T-Zellen beschrieben, welche sich auch durch eine Expression von CCR6, ROR $\gamma$ t, AHR, IL-23R, und von Rezeptoren für mikrobielle Bestandteile (TLR1, TLR2, Dectin-1) und eine Produktion von IL-17A, IL-21 auszeichnen [105, 106].

Neben NK-Zellen des peripheren Blutes wurden kürzlich auch IL-22-produzierende humane und murine Darm-Mukosa-assoziierte NK-Zellen beschrieben, sogenannte NK-22-Zellen, welche keine klassischen NK-Zell-Funktionen ausüben und für die konstitutive IL-22-Expression im Darm verantwortlich sind und die Aufrechterhaltung der Integrität dieses mukosalen Gewebes vermitteln. Neben IL-22 sind diese Zellen auch in der Lage große Mengen an IL-26, LIF und IL-10 zu produzieren [107]. Eine Expression von IL-22 wurde außerdem in murinen NKT-Zellen nachgewiesen [108].

Im Gegensatz zu T-, NK-, und NKT-Zellen stellen B-Zellen, Monozyten, Makrophagen und DCs wahrscheinlich keine IL-22-Produzenten dar [58, 59]. Unklar ist noch, ob auch nichthämatopoetische Zellen als IL-22-Produzenten ausscheiden. So wurde in einer ersten Arbeit beschrieben, daß primäre humane Keratinozyten sowohl in ruhendem Zustand als auch nach einer Stimulation mit IFN- $\gamma$ , IL-4 oder IL-1 $\beta$  keine IL-22-mRNA-Expression aufweisen [109, 110].

*In vivo* wurde eine Expression von IL-22 in drei verschiedenen murinen Infektionsmodellen beschrieben, in Milz und Niere nach Induktion einer polymikrobiellen Peritonitis, im Darm *Citrobacter rodentium*-infizierter Mäuse, sowie in der Lunge *Klebsiella pneumoniae*-infizierter Mäuse [100, 111, 112]. Dabei war die IL-22-Expression klar von IL-23 abhängig, wie die fehlende IL-22-Expression infizierter IL-23p19-defizienter Mäuse zeigte [100, 111]. Ähnliche IL-22-Expressionslevel in *Citrobacter rodentium*-infizierten Wildtyp und Rag2-defizienten Mäuse lassen hierbei eine andere zelluläre Quelle als aktivierte T-Zellen vermuten. Auch im humanen System sind bakterielle Infektionen mit erhöhten IL-22-Spiegeln assoziiert. Dies wurde für Patienten mit *Mycobacterium*

*tuberculosis*-Infektion beschrieben, wobei die IL-22-Produktion in spezifischen „Central-Memory“-T-Zellen nachgewiesen wurde [113].

Die Expression von IL-22 ist auch mit verschiedenen chronisch-entzündlichen Erkrankungen beim Menschen, in welchen Memory-T-Zellen eine wesentliche Rolle spielen, assoziiert. So konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, daß IL-22 in der Haut von Patienten mit Psoriasis vulgaris, nicht jedoch in der Haut gesunder Kontrollprobanden massiv exprimiert ist [109]. Hier wurden die Haut-infiltrierenden psoriatischen T-Zellen als starke IL-22-Produzenten nachgewiesen [114]. Die Neutralisierung von IL-22 in einem murinen Psoriasis-Modell, welches durch einen adoptiven Transfer von CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>++</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen in Pathogen-freie *scid/scid* Mäuse induziert wurde, führte zur Verminderung der pathologischen Hautveränderungen und zeigt die wesentliche Rolle von IL-22 bei der Psoriasis [115]. Auch bei der Atopischen Dermatitis, einer weiteren chronisch-entzündlichen Hauterkrankung ist die kutane Expression von IL-22 sehr stark erhöht [109].

Weiter wurde eine starke IL-22-Expression auch in entzündeten Arealen der Darm-Mukosa von Patienten mit aktivem Morbus Crohn und Ulcerativer Colitis, nicht jedoch von gesunden Probanden beschrieben, wobei CD4<sup>+</sup> T-Zellen hier als zelluläre Quelle nachgewiesen wurden [116, 117]. Im Einklang damit wurde eine verstärkte IL-22-Expression im Kolon in verschiedenen murinen Kolitis-Modellen, der durch Natriumdextransulfat („dextran sulfate sodium, DSS) induzierten Kolitis, der Th2-vermittelten (TCR $\alpha$ -defiziente Mäuse) und Th1-vermittelten (induziert durch adoptiven Transfer von CD45RB<sup>++</sup> T-Zellen) Kolitis nachgewiesen [118]. Eine verstärkte IL-22-Expression wurde auch in der Leber von Mäusen mit einer durch ConA, CCl<sub>4</sub> oder das murine Cytomegalievirus (MCMV) induzierten T-Zell-vermittelten Hepatitis, einer LPS/D-Galactosamin-induzierten Hepatitis, sowie bei humaner Hepatitis verschiedener Ätiologie gezeigt [119, 120, 121]. Zu weiteren mit einer verstärkten IL-22-Expression assoziierten entzündlichen Erkrankungen im Menschen bzw. im Mausmodell zählen Autoimmunmyocarditis, Rheumatoide Arthritis, Zystische Fibrose, Multiple Sklerose und Autoimmunenzephalomyelitis [111, 122, 123, 124, 125]. Im Gegensatz zu diesen Erkrankungen wurde in der bronchoalvöolären Lavage von Patienten mit pulmonaler Sarkoidose im Vergleich zu gesunden Probanden eine Verminderung der IL-22 Spiegel beschrieben [126]. Es ist allerdings bis *dato* völlig unklar, ob dem Krankheitsbild oder der Schwere des Verlaufs ein IL-22-Mangel zugrunde liegt.

### 1.3.3 Zellulärer IL-22-Rezeptor und Signaltransduktion

IL-22 vermittelt seine biologischen Effekte durch Bindung an einen heterodimeren zelloberflächenständigen Rezeptor, der aus den zur CRF2 gehörenden Rezeptorketten IL-22R1 und IL-10R2 besteht [70, 71]. Wie in Kapitel 1.2 erwähnt, vermittelt IL-22R1 zusammen mit IL-20R2 auch biologische Effekte von IL-20 und IL-24, während die IL-10R2-Rezeptorkette auch als Teil des Rezeptors für IL-10, IL-26, IL-28 $\alpha$ , IL-28 $\beta$  und 29 fungiert [17]. Das Gen für IL-10R2 (NCBI Eintrag NT\_011512) befindet sich in der Nähe der *IFNAR1*-, *IFNAR2*- und *IFNGR2*-Genloci auf Chromosom 21q22.11. *IL22R1* (NCBI Eintrag NT\_004610) ist auf Chromosom 1p36.11 nahe *IL28R1* lokalisiert. Die IL-10R2- und IL-22R1-kodierenden Gene bestehen aus jeweils 7 Exons, wobei die Exons 2 bis 7 die Protein-kodierende Sequenz enthalten. Das resultierende unreife IL-10R2-Protein (NCBI Referenzsequenz NP\_000619) besteht aus 325 AS, wobei die ersten 19 AS das Signalpeptid bilden. Daran schließt sich ein 201 AS langer, die extrazelluläre Domäne bildender Teil, ein 22 AS langer transmembranärer Teil, sowie eine intrazelluläre Domäne, welche aus 83 AS aufgebaut ist. Das unreife 574 AS lange IL-22R1-Protein (NCBI Referenzsequenz NP\_067081) besteht aus einem Signalpeptid, welches von den ersten 15 AS gebildet wird, einer 213 AS langen extrazellulären Domäne, einem sich anschließenden 21 AS langen transmembranären Anteil, sowie einer langen intrazellulären Domäne von 325 AS. Nach Abspaltung der jeweiligen Signalpeptide ergeben sich daher Proteine von 306 (IL-10R2) und 559 (IL-22R1) AS Länge. Gegenüber IL-10R2 weist IL-22R1 somit einen längeren intrazellulären Teil auf, welcher 4 potentielle STAT-Bindungsstellen enthält. Die extrazellulären Domänen von IL-10R2 und IL-22R1 beinhalten 4 (IL-10R2) und 3 (IL-22R1) potentielle N-Glykosylierungsstellen (N-X-T/S).

Während die IL-10R2-Rezeptorkette ubiquitär von hämatopoietischen und nichthämatopoietischen Zellen exprimiert wird, ist die Expression von IL-22R1 auf nichthämatopoietische Zellen ausgewählter Gewebe, welche eine äußere Barriere des Körpers darstellen, insbesondere des respiratorischen und gastrointestinalen Systems und der Haut beschränkt [109]. So konnte unsere Arbeitsgruppe zeigen, daß die fehlende Expression von IL-22R1 und die fehlende Signaltransduktion von IL-22 in Immunzellen diese Zellen als Zielzellen von IL-22 ausschließt [109].

Während IL-22 die IL-22R1-Rezeptorkette mit hoher Affinität bindet ( $K_D \leq 20$  nM), besitzt IL-22 nur eine sehr geringe Affinität zu IL-10R2 ( $\sim 1$  mM) [24, 127]. Im Einklang damit wurde in einem Enzym-gekoppelten Immunabsorptionsnachweis (ELISA)-ähnlichen System gezeigt, daß biotinyliertes IL-22 an immobilisierte IL-22R1-Fc-Homodimere und nicht an immobilisierte IL-10R2-Fc-Homodimere bindet, IL-10R2 jedoch die Bindung von IL-22 an IL-22R1/IL-10R2-Fc Heterodimere verstärkt [23]. Eine detaillierte Untersuchung



möglicher Rezeptor- und Ligandenbindungsstellen mittels Peptid-Scan zeigte, daß IL-10R2 mit IL-22-abgeleiteten Peptiden interagiert, jedoch keine Interaktion von IL-22 mit IL-10R2-abgeleiteten Peptiden stattfindet [27]. Demnach schließt die Bindung von IL-22 an IL-10R2 IL-22-Epitope ein, welche nicht an der Moleküloberfläche zugänglich sind. Dies unterstützt die Hypothese, daß ähnlich wie für die IL-10-Bindung an den IL-10-Rezeptor vermutet, eine sequenzielle Bindung von IL-22 an seinen zelloberflächenständigen Rezeptor stattfindet [25, 128]. Gemäß dieser Hypothese führt die initiale Bindung von IL-22 an IL-22R1 zu einer Konformationsänderung im IL-22-Molekül. IL-10R2 kann durch diese Konformationsänderung an IL-22 binden und den Rezeptorkomplex vervollständigen.

Die Bindung von IL-22 an seinen zelloberflächenständigen Rezeptorkomplex löst vornehmlich eine Signaltransduktion über den Jak/STAT-Signalweg aus. Es ist bekannt, daß der intrazelluläre Teil von IL-10R2 in Assoziation mit der zur Janus-Familie gehörenden Tyrosinkinase (Tyk)2 vorliegt [129]. Da eine IL-22-Stimulation neben der Phosphorylierung von Tyk2 auch eine Phosphorylierung von Jak1 bewirkt, wird vermutet, daß IL-22R1 mit Jak1 assoziiert vorliegt [130]. Die IL-22-induzierte Aktivierung von Jak1 und Tyk2 bewirkt daraufhin eine Phosphorylierung von Tyrosinresten in der intrazellulären Domäne von IL-22R1. Wie erwähnt, enthält diese 4 solcher potentiellen STAT3-Bindungsstellen [70].

Eine detaillierte Untersuchung der Signaltransduktion von IL-22 in H4IIE-Ratten-Hepatomzellen zeigte, daß IL-22 in diesen Zellen eine Tyrosinphosphorylierung von STAT1, STAT3 und STAT5 sowie eine Serinphosphorylierung von STAT3 bewirkt [130]. Weiterhin induzierte IL-22 in diesen Zellen eine Signaltransduktion über die drei Hauptwege der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Kaskade durch Phosphorylierung der Kinasen p38, JNK und ERK1/2 [130]. In weiteren Arbeiten wurde eine Tyrosinphosphorylierung von STAT3 und zum Teil auch von STAT1 und STAT5 durch IL-22 in verschiedensten von Gewebszellen abgeleiteten Zelllinien gezeigt [69, 71, 117, 126, 131, 132, 133]. Wenige Arbeiten untersuchten die Signaltransduktion von IL-22 in primären Zellen. Durch unsere Arbeitsgruppe wurde eine IL-22-induzierte Tyrosinphosphorylierung von STAT3 in humanen primären Keratinozyten gezeigt [109]. In humanen primären subepithelialen Myofibroblasten des Darmes wurde neben einer Aktivierung von STAT3 auch eine Aktivierung von ERK1/2, JNK, p38 und NF- $\kappa$ B durch IL-22 nachgewiesen [116]. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit einer IL-22-induzierten Aktivierung von ERK1/2 und p38 in humanen primären synovialen Fibroblasten [123].

### 1.3.4 Biologische Effekte von IL-22

Wie in Kapitel 1.3.3. erwähnt, stellen Gewebezellen, insbesondere der Haut sowie des respiratorischen und gastrointestinalen Systems, nicht jedoch Immunzellen, Zielzellen von IL-22 dar. Die biologischen Effekte von IL-22 auf seine Zielzellen sind bislang im Detail insbesondere auf Hepatozyten, Keratinozyten, Darmzellen, Pankreas-Azinus Zellen und Endothelzellen des Gehirns untersucht. Im Großen und Ganzen scheint es, daß IL-22 die antimikrobielle Abwehr äußerer Körperbarrieren fördert, einen Schutz der Gewebe vor Schädigung vermittelt und deren Regeneration fördert. Die biologische Wirkung von IL-22 beinhaltet außerdem eine inflammatorische Komponente, insbesondere durch die Induktion von Granulozyten-wirksamen Chemokinen, und eine Rolle bei der Tumorabwehr.

Nachfolgend soll auf die Effekte von IL-22 eingegangen werden, welche zu Beginn meiner Promotionsarbeit bekannt waren. Die im Nachhinein bekannt gewordenen Wirkungen des Zytokins, welche in Beziehung mit meinen eigenen, hier in dieser Arbeit beschriebenen Erkenntnissen stehen, sollen insbesondere im Kapitel „Diskussion“ beschrieben werden.

Zu den ersten beschriebenen Effekten von IL-22 zählt die Induktion von Akut-Phase-Proteinen wie Serum-Amyloid-A (SAA),  $\alpha$ 1-Antichymotrypsin und Haptoglobin in humanen hepatozellulären Karzinomzellen *in vitro* und in der murinen Leber *in vivo* [69]. Während  $\alpha$ 1-Antichymotrypsin durch die Degradation von während entzündlicher Prozesse in großen Mengen gebildeten Proteasen zu einer Limitierung der Gewebeschädigung beiträgt, fördert SAA die Opsoninierung und Phagozytose von Gram-negativen Bakterien [134, 135]. Eine der Hauptfunktionen von Haptoglobin ist die Bindung von Hämoglobin und einem damit verbundenen Schutz vor Hämoglobin-induzierter oxidativer Gewebeschädigung [136].

Durch eine Induktion der Expression von antimikrobiellen Proteinen bewirkt IL-22 eine Steigerung der angeborenen Immunabwehr in Organen, welche äußere Körperbarrieren darstellen. Dieser Effekt wurde erstmalig durch unsere Arbeitsgruppe anhand von primären humanen Keratinozyten gezeigt. In diesen Zellen bewirkte IL-22 eine Induktion der mRNA-Expression der  $\beta$ -Defensine(BD)2 und BD3 [109]. Diese kleinen kationischen Proteine entfalten ihre antimikrobielle Wirkung durch Destabilisierung der Zellmembran Gram-positiver und Gram-negativer Bakterien, besitzen jedoch auch fungizide und antivirale Wirkung [137].

Neben der Induktion von Akut-Phase-Proteinen und antimikrobiellen Proteinen übt IL-22 eine regenerative Wirkung auf seine Zielzellen aus. In murinen Pankreas-Azinus-Zellen induziert IL-22 *in vitro* und *in vivo* die mRNA-Expression von Pankreatitis-assoziiertem Protein 1 (PAP1) und von Osteopontin, zwei Proteinen mit protektiven Effekten [131]. Osteopontin ist ein multifunktionelles Zytokin mit chemotaktischen, antiapoptotischen und

immunstimulatorischen Eigenschaften, welches die zelluläre Immunantwort vor allem durch die Förderung der Differenzierung von T-Zellen in Th1-Zellen aktiviert. Weiterhin unterstützt Osteopontin die Wundheilung und spielt eine entscheidende Rolle beim Schutz mukosaler Gewebe vor Schädigung [138, 139]. PAP1 bewirkt Zellschutz durch Induktion einer Resistenz gegen TNF- $\alpha$ -induzierte Apoptose, wirkt antimikrobiell gegen Gram-positive und Gram-negative Bakterien und entfaltet eine protektive Wirkung bei entzündlichen Prozessen in Organen wie Pankreas, Lunge und Kolon [140, 141, 142, 143, 144].

In der Leber vermittelt IL-22 einen Schutz bei T-Zell-vermittelter muriner Hepatitis durch eine STAT3-vermittelte Leberzellregeneration [120, 121, 145]. Im Einklang damit scheinen IL-22-defiziente Mäuse hoch suszeptibel gegenüber einer ConA-vermittelter Hepatitis zu sein [121]. Als mögliche Mechanismen wurden hier antiapoptotische und mitogene Effekte von IL-22 beschrieben, welche bei stabiler IL-22-Überexpression in durch Serumentzug geschädigten HepG2-Zellen nachweisbar sind [120]. Diese Zellen wiesen hierbei eine verstärkte Expression von antiapoptotischen (Bcl-xL, Bcl-2 and Mcl1) und mitogenen (c-myc, cyclin D1, Rb2, CDK4) Proteinen auf und förderten eine Tumorbildung in immundefizienten Nacktmäusen [120]. Im Gegensatz dazu zeigte eine andere Arbeit, daß IL-22 zu einem verminderten Tumorwachstum in Mäusen, wahrscheinlich durch einen Zellzyklusarrest in der G2-M-Phase und eine Reduktion der proliferationsregulierenden Signalmoleküle Erk1/2 und Akt, jedoch nicht durch Apoptose, führt [146]. Im Einklang damit wurde ein verlängertes Überleben von Mäusen, welche mit IL-22-exprimierenden Tumorzellen behandelt wurden, beschrieben [147].

### 1.3.5 IL-22BP – ein löslicher IL-22-Rezeptor

Neben dem zelloberflächenständigen IL-22-Rezeptor gibt es einen weiteren, jedoch löslichen und monomeren IL-22-bindenden Rezeptor, welcher als IL-22-Bindungsprotein (IL-22BP) bezeichnet wird, auch ein Mitglied der CRF2 darstellt und unter anderem durch unsere Arbeitsgruppe entdeckt wurde [148, 149, 150]. Dieser lösliche Rezeptor wird durch ein eigenständiges Gen, *IL22RA2*, kodiert. *IL22RA2* (NCBI Eintrag NT\_025741) befindet sich zusammen mit den Genen *IL20R1* und *IFNGR1* auf Chromosom 6q23. Durch alternatives Spleißen umfassen die *IL22RA2* Expressionsprodukte neben dem IL-22BP noch zwei weitere Spleißvarianten. Während die zweite Spleißvariante das IL-22BP darstellt, sind die möglichen Liganden der Variante 1 und Variante 3 noch unbekannt [148, 149, 150].

*IL-22RA2* enthält 6 Protein-kodierende Exons, wobei das IL-22BP durch Herausspleißen des Exons 4 gebildet wird. Das unreife IL-22BP (NCBI Referenzsequenz NP\_851826),

besteht aus 231 AS, wobei die ersten 21 AS das Signalpeptid bilden. Die sich anschließenden 210 AS sind mit der extrazellulären Domäne von IL-22R1 zu 34% identisch und zeigen eine dem IL-22R1 ähnliche Struktur. IL-22BP ist durch das Vorhandensein von 5 potentiellen N-Glykosylierungsstellen gekennzeichnet.

Die Expression von IL-22BP wurde in Organen des weiblichen Reproduktionssystems (Plazenta, Brustgewebe), aber auch in lymphatischen Organen (Thymus, Milz, Lymphknoten), in Organen des gastrointestinalen Systems (Magen, Kolon), in der Lunge und der Haut nachgewiesen [148, 149, 150]. Die genaue zelluläre Quelle von IL-22BP ist jedoch noch unklar [148, 149, 151]. Zu Beginn meiner Promotionsarbeit war bekannt, daß IL-22BP isoliert IL-22 bindet und dessen Bindung an den zelloberflächenständigen IL-22-Rezeptor, sowie in hohen Konzentrationen die Signaltransduktion von IL-22 *in vitro* neutralisiert [148, 150, 152]. Die biologische Bedeutung dieses löslichen IL-22-Rezeptors war jedoch noch völlig unklar.

## 1.4 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, zur Erweiterung des Wissens über IL-22 beizutragen. Dazu sollten vier Themenkomplexe beleuchtet werden: 1) die Produktion von IL-22, 2) die Zielzellen von IL-22 in der Haut und der Leber, 3) die Effekte von IL-22 auf die in der Haut und der Leber identifizierten Hauptzielzellen sowie 4) die Rolle des IL-22BP.

1) Im ersten Teil der Arbeit sollte die **Produktion von IL-22** durch humane Immunzellen und ausgewählte humane Gewebszellen unter verschiedenen Bedingungen auf Proteinebene näher untersucht werden. Weiterhin sollten die lokalen und systemischen IL-22-Spiegel *in vivo* in chronisch-entzündlichen Zuständen untersucht werden. Dazu wurden die chronisch-entzündlichen Erkrankungen Psoriasis und Morbus Crohn, sowie ein experimentelles Mausmodell, die DSS-induzierte Kolitis, ausgewählt.

2) Zur Identifizierung und Charakterisierung der **Zielzellen von IL-22** sollten die unterschiedlichen Zelltypen der humanen Haut sowie Hepatozyten der humanen Leber bezüglich ihrer Expression des IL-22-Rezeptorkomplexes sowie ihrer Sensitivität gegenüber einer IL-22-Stimulation analysiert werden. In den identifizierten Zielzellen sollte anschließend die IL-22-induzierte Signaltransduktion im Detail untersucht werden.

3) Im dritten Teil der Arbeit sollten die **Effekte von IL-22** auf die in der Haut und der Leber identifizierten Hauptzielzellen sowie deren zugrunde liegende Mechanismen charakterisiert werden. Schließlich sollte nach der Präsenz der identifizierten IL-22-Effekte bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen in den oben genannten Patienten gesucht werden.

4) Zum besseren Verständnis der **Rolle von IL-22BP** sollte die Affinität von IL-22BP zu

IL-22 untersucht werden und aus diesen Ergebnissen resultierende Voraussagen zur möglichen positiven oder negativen regulatorischen Rolle von IL-22BP mittels *in vitro*-Assays bestätigt werden. Abschließend sollte die Expression von IL-22BP bei ausgewählten chronisch-entzündlichen Zuständen analysiert werden.

Der Fokus der Arbeit sollte vor allem auf dem Themenkomplex der Effekte von IL-22 auf die Hauptzielzellen in der Haut und der Leber liegen. In dieser Arbeit sollten zahlreiche zellbiologische, biochemische, immunologische sowie molekularbiologische Techniken zum Einsatz kommen.

## 2 MATERIAL

### 2.1 Zellkultur

#### 2.1.1 Primäre Zellen

normale humane Keratinozyten adulter Spender, NHEK-Ad	Lonza, Verviers, Belgien
normale humane dermale Fibroblasten adulter Spender, NHDF-Ad	Lonza, Verviers, Belgien
humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen adulter Spender, HMVECad	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
humane epidermale Melanozyten adulter Spender heller Pigmentierung, HEMa-LP	Invitrogen GmbH, Karlsruhe Lonza, Verviers, Belgien
normale humane Hepatozyten, hNHEPS <sup>®</sup>	BD Biosciences, Heidelberg
BD Gentest <sup>™</sup> humane Hepatozyten	

#### 2.1.2 Zelllinien

HepG2 (humanes Hepatozyten-Karzinom)	European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Großbritannien
---	--

#### 2.1.3 Reagenzien zur Zellseparation

Ficoll-Paque <sup>™</sup> Plus	GE Healthcare, Freiburg
BD Gentest <sup>™</sup> One-Step Hepatocyte Purification Kit	BD Biosciences, Heidelberg
Dulbecco's PBS, Phosphatpuffer ohne Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , NaHCO <sub>3</sub>	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Trypanblau	Biowhittaker, Walkersville, Großbritannien
Clonetics <sup>®</sup> Trypsin / Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)-Lösung (0,025% Trypsin / 0,01% EDTA)	Lonza, Verviers, Belgien
Clonetics <sup>®</sup> Trypsin-neutralisierende Lösung	Lonza, Verviers, Belgien
Trypsin / EDTA-Lösung (0,025% Trypsin / 0,01% EDTA)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

Trypsin-neutralisierende Lösung	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Trypsin / EDTA-Lösung (0,05% Trypsin / 0,53 mM EDTA)	Invitrogen GmbH, Karlsruhe

#### 2.1.4 Medien, Mediumzusätze und Reagenzien zur Subkultivierung

fetales bovines Serum (FBS)	Biochrom KG, Berlin
L-Glutamin	Biochrom KG, Berlin
VLE RPMI 1640 Medium mit 2,0 g/l NaHCO <sub>3</sub> (Endotoxingehalt < 0,01 EU/ml)	Biochrom KG, Berlin
KBM <sup>®</sup> Basalmedium	Lonza, Verviers, Belgien
KGM <sup>®</sup> SingleQuots <sup>®</sup> Mediumzusätze und Wachstumsfaktoren	Lonza, Verviers, Belgien
FBM <sup>®</sup> Basalmedium	Lonza, Verviers, Belgien
FGM <sup>®</sup> -2 SingleQuots <sup>®</sup> Mediumzusätze und Wachstumsfaktoren	Lonza, Verviers, Belgien
Medium 131	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
MVGS Mediumzusätze und Wachstumsfaktoren	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Medium 254	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
HMGS-2 Mediumzusätze und Wachstumsfaktoren	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
HBM <sup>™</sup> Basalmedium	Lonza, Verviers, Belgien
HCM <sup>™</sup> SingleQuots <sup>®</sup> Mediumzusätze und Wachstumsfaktoren	Lonza, Verviers, Belgien
Hepato-STIM <sup>™</sup> Medium	BD Biosciences, Heidelberg
EGF Hepatozytenmediumzusatz	BD Biosciences, Heidelberg
EMEM mit Earl's Salzen und NaHCO <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
nichtessentielle Aminosäuren (NEAA)	Biochrom KG, Berlin

#### 2.1.5 Rekombinante Zytokine, Antikörper, lösliche Rezeptoren

rhIL-1 $\beta$	R&D Systems, Wiesbaden
rhIL-2	R&D Systems, Wiesbaden
rhIL-4	R&D Systems, Wiesbaden
rhIL-6	R&D Systems, Wiesbaden

rhIL-12	R&D Systems, Wiesbaden
rhIL-22	R&D Systems, Wiesbaden
rhTNF- $\alpha$	R&D Systems, Wiesbaden
rhIFN- $\gamma$	R&D Systems, Wiesbaden
Anti-huCD3-mAk, Maus, Orthoclone R OKT3	Cilag GmbH, Sulzbach
Anti-huCD28-mAk (Isotyp: IgG1), Maus, Klon 37407.11	R&D Systems Wiesbaden
Anti-huIL-10R2-pAk, Ziege	R&D Systems, Wiesbaden
IgG, pAk, Ziege	R&D Systems, Wiesbaden
rhIL-22BP <sub>2</sub> -Fc-Chimer	R&D Systems, Wiesbaden

### 2.1.6 Bakterielle Stimuli

LPS [ <i>Escherichia coli</i> ( <i>E.coli</i> )] 0127:B8)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
PANSORBIN <sup>®</sup> , Formalin-fixierte und hitzeinaktivierte <i>Staphylococcus aureus</i> Zellen	Calbiochem-Novabiochem, Bad Soden

### 2.1.7 Weitere Reagenzien für die Zellstimulation

Actinomycin D	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Cycloheximid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Methylamin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Indomethacin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Pertussis Toxin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TAPI-2	Merck Biosciences, Schwalbach/Ts
Ethanol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ampuwa bidestilliertes Wasser	Fresenius-Kabi AG, Bad Homburg
CaCO <sub>2</sub>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

### 2.1.8 Ausgewählte Verbrauchsmaterialien

S-Monovette <sup>®</sup> NC9 (Citrat), 10 ml	Sarstedt AG & Co, Nümbrecht
LeucoSep <sup>®</sup> -Röhrchen, 50 ml, steril	Greiner, Frickenhausen



BD BioCoat™ Thin Layer Matrigel™ 24-well  
Zellkulturplatten

BD Biosciences, Heidelberg

### 2.1.9 Geräte

CO<sub>2</sub>-Inkubator SanyoMCO-18 AIC  
Durchlichtmikroskop Olympus BX45TF  
Neubauer-Zählkammer  
Werkbank für Sterilarbeit Hera Safe  
Multifuge 3 S-R  
Zentrifuge 5810

Cotech GmbH, Berlin  
Olympus, Hamburg  
Schreck, Hofheim  
Heraeus, Hanau  
Heraeus, Hanau  
Eppendorf, Hamburg

## 2.2 Durchflußzytometrie

### 2.2.1 Puffer und Pufferzusätze

FACS-Puffer (1 x) :

Dulbecco's PBS ohne Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>,  
NaHCO<sub>3</sub>  
NaN<sub>3</sub>, 0,1%

FBS, 2%

PAA Laboratories GmbH, Cölbe

Serva Electrophoresis GmbH,  
Heidelberg

Biochrom KG, Berlin

FACSFlow™, Trägerflüssigkeit für  
Durchflußzytometrie

BD Biosciences, Heidelberg

### 2.2.2 Antikörper für die Durchflußzytometrie

FITC-markierter Anti-huCD69-mAk,  
(Isotyp: IgG1), Klon L78, Maus  
FITC-markierter IgG1/ $\kappa$ -mAk, Klon X40, Maus  
PE-markierter Anti-huCD16-mAk,  
(Isotyp: IgG1), Klon 3G8, Maus  
PE-markierter Anti-huCD56-mAk,  
(Isotyp: IgG1), Klon N901, Maus

BD Biosciences, Heidelberg

BD Biosciences, Heidelberg

Beckmann Coulter, Krefeld

Beckmann Coulter, Krefeld

PC5-markierter Anti-huCD14-mAK, (Isotyp: IgG2a), Klon RMO52, Maus	Beckmann Coulter, Krefeld
APC-markierter Anti-huCD3-mAK, (Isotyp: IgG1), Klon SK7, Maus	BD Biosciences, Heidelberg
APC-markierter Anti-huCD4-mAK (Isotyp: IgG1), Klon RPA-T4, Maus	BD Biosciences, Heidelberg
PE-markierter Anti-huCD8-mAK (Isotyp: IgG1), Klon B9.11, Maus	Beckmann Coulter, Krefeld
PC5-markierter Anti-huCD19-mAK, (Isotyp: IgG1), Klon HIB19, Maus	BD Biosciences, Heidelberg

### 2.2.3 Ausgewählte Verbrauchsmaterialien

Micronics, PPN-Röhrchen, 1,2 ml	ICN, Eschwege
---------------------------------	---------------

### 2.2.4 Geräte

FACSCalibur™ mit assoziierter Software CellQuest Version 1.6.3	BD Biosciences, Heidelberg
Vakuumpumpe Laboport	KNF Neuberger, Freiburg
Variomag Monoshake Plattenschüttler	H+P Labortechnik AG, Magdeburg
MS1 Minishaker, Schüttler	IKA-Werke GmbH & Co KG, Staufen
Multifuge® 3 S-R	Heraeus, Hanau

## 2.3 Westernblot-Analyse

### 2.3.1 Puffer und Pufferzusätze

Basis-Extraktionspuffer pH 7,5 (1 x) :

TRIS-Base, 15 mM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NaCl, 120 mM	Merck Biosciences, Schwalbach/Ts.
KCl, 25 mM	Merck Biosciences, Schwalbach/Ts.
Ethylenglykoltetraessigsäure (EGTA), 2 mM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
EDTA, 2 mM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Triton X-100, 0,5% v/v	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Lysepuffer auf Grundlage von Basis-Extraktionspuffer (1 x) :

Dithiotreitol, 0,1 mM	Boehringer, Mannheim
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail I, 1% v/v	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phosphatase-Inhibitor-Cocktail II, 1% v/v	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Complete Proteinase-Inhibitor, 4% v/v	Roche Diagnostics, Mannheim

TBST-Puffer pH 7,5 (1 x) :

TRIS-Base, 25 mM	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
NaCl, 150 mM	Merck Biosciences, Schwalbach/Ts.
Tween 20, 0,05% v/v	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

Block-Puffer auf Basis von TBST-Puffer (1 x) :

Magermilchpulver, 5% w/v	TSI GmbH, Zewen
--------------------------	-----------------

Ak-Bindungs-Puffer auf Basis von TBST-Puffer (1 x) :

BSA, 5% w/v	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg
-------------	---

### 2.3.2 Reagenzien und Kits

BCA-Protein-Assay Kit	Perbio, Bonn
ECL-Reagent Kit	Amersham Biosciences, Freiburg

### 2.3.3 Antikörper

Anti-huSTAT3-pAk, Kaninchen	New England Biolabs, Frankfurt/Main
Anti-huI $\kappa$ B- $\alpha$ -pAk, Kaninchen	New England Biolabs, Frankfurt/Main
Anti-huP-STAT1-pAk (Tyr701), Kaninchen	New England Biolabs, Frankfurt/Main
Anti-huP-STAT3-pAk (Tyr705), Kaninchen	New England Biolabs, Frankfurt/Main
Anti-huP-STAT5-pAk (Tyr694), Kaninchen	New England Biolabs, Frankfurt/Main
Anti-huP-p38-pAk (Thr180/Tyr182), Kaninchen	New England Biolabs, Frankfurt/Main
Anti-huP-JNK/SAPK-pAk (Thr202/Tyr204), Kaninchen	New England Biolabs, Frankfurt/Main
Anti-huP-Erk1/2-pAk (Thr180/Tyr182), Kaninchen	New England Biolabs, Frankfurt/Main
Anti-huP-I $\kappa$ B- $\alpha$ pAk (Ser32), Kaninchen	New England Biolabs, Frankfurt/Main
Peroxidase-konjugierter AffiniPure	Dianova, Hamburg

F(ab')<sub>2</sub>-Fragment Ziege Anti-Kaninchen IgG

#### 2.3.4 Ausgewählte Verbrauchsmaterialien

MagicMark™ XP Western Protein-Standard	Invitrogen, Karlsruhe
SeaBlue® Farbstoff-gekoppelter Protein-Standard	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris-Gel	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® MES SDS Laufpuffer	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® LDS Probenpuffer	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® reduzierendes Agenz	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® Antioxidant	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® Transferpuffer	Invitrogen, Karlsruhe
Nitrocellulose-Membran 0,2 µm - Filterpapier-Einheit	Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol reinst	J.T. Baker, Griesheim
Hyperfilm ECL™	Amersham Biosciences, Freiburg
Entwickler G153	Agfa, Köln
Fixierer G354	Agfa, Köln

#### 2.3.5 Geräte

Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Minishaker MS2, Schüttler	IKA-Werke GmbH & Co KG, Staufen
SpectraMax 340PC <sup>384</sup>	Molecular Devices, Ismaning/München
Thermomixer comfort, Heizblock	Eppendorf, Hamburg
PowerEase® 500 Stromversorgungsgerät	Invitrogen, Karlsruhe
XCell SureLock™ Elektrophoresekommer	Invitrogen, Karlsruhe
XCell II™ Blot-Modul	Invitrogen, Karlsruhe
Blotting-Schwamm	Invitrogen, Karlsruhe
Dumax 1030 Schüttler	Heidolph, Nürnberg
Bio Shaker 3D Wippschüttler	Lab4You, Berlin
ECL™ Hyperfilm-Kassette	Amersham Biosciences, Freiburg

## 2.4 Molekularbiologie

### 2.4.1 Reagenzien und Kits

PIQOR™ SkinPatho Microarray	Memorec Biotec, Köln
Aqua-Roti®-Phenol, wassergesättigtes Phenol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Chloroform, z. A.	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DNase-/RNase-freies Wasser	Gibco BRL / Life Technologies, Karlsruhe
Ethanol, z. A.	Merck Biosciences, Schwalbach/Ts.
Glykogen	Roche, Mannheim
Invisorb® RNA-Kit II	InViTek GmbH, Berlin
MMLV-Reverse Transkriptase	Life Technologies, Karlsruhe
MMLV RT Puffer Set	Life Technologies, Karlsruhe
Oligo-d(T) <sub>12-18</sub> -Primer	Amersham Biosciences, Freiburg
RNA 6000 Kit für Bioanalyzer	Agilent Technologies, Waldbronn
RNAasin® Ribonuklease-Inhibitor	Promega, Mannheim
RNA 6000LabChip® Kit	Agilent Technologies, Waldbronn
TaqMan™ Universal PCR Master Mix mit Uracil-N-Glycosylase AmpErase®	Applied Biosystems, Weiterstadt
UltraPure dNTP Set	Amersham Biosciences, Freiburg
Assay on Demand: huHPRT (NM_000194.2)	Applied Biosystems, Weiterstadt
Assay on Demand: huS100A7 (NM_002963.3)	Applied Biosystems, Weiterstadt
Assay on Demand: huS100A8 (NM_002964.3)	Applied Biosystems, Weiterstadt
Assay on Demand: huS100A9 (NM_002965.3)	Applied Biosystems, Weiterstadt
Assay on Demand: huCALML5 (NM_017422.3)	Applied Biosystems, Weiterstadt
Assay on Demand: huDSC1 (NM_024421.1/ NM_004948.2 )	Applied Biosystems, Weiterstadt
Assay on Demand: huKRT10 (NM_000421.2)	Applied Biosystems, Weiterstadt
Assay on Demand: huMMP1 (NM_002421.2)	Applied Biosystems, Weiterstadt
Assay on Demand: huIFN-γ (NM_000619.2)	Applied Biosystems, Weiterstadt
Assay on Demand: huIL-1β (NM_000576.2)	Applied Biosystems, Weiterstadt
Assay on Demand: huLBP (NM_004139.2)	Applied Biosystems, Weiterstadt
Assay on Demand: mHPRT (NM_13556.2)	Applied Biosystems, Weiterstadt
Assay on Demand: mS100A8 (NM_013650.2)	Applied Biosystems, Weiterstadt
Assay on Demand: mS100A9 (NM_009114.2)	Applied Biosystems, Weiterstadt
Assay on Demand: mMMP1 (NM_032006.3)	Applied Biosystems, Weiterstadt

Assay on Demand: mIFN- $\gamma$ (NM_008337.3)	Applied Biosystems, Weiterstadt
Assay on Demand: mL17A (NM_010552.3)	Applied Biosystems, Weiterstadt
Assay on Demand: mL-17F (NM_145856.2)	Applied Biosystems, Weiterstadt
Assay on Demand: mLBP (NM_008489.2)	Applied Biosystems, Weiterstadt

## 2.4.2 Synthetische Oligonukleotide

Die nachfolgend aufgeführten synthetischen Oligonukleotide (Tab. 1) wurden durch die Firma TibMolbiol, Berlin synthetisiert.

**Tab. 1: Nachweissysteme für TaqMan<sup>TM</sup>-PCR**

Gen	Oligonukleotid-Sequenzen und Lage im Gen	eingesetzte Konzentration
huHPRT-1	5'- AGTCTGGCTTATATCCAACACTTCG -3' (Exon 6)	300 nM
	5'- GACTTTGCTTTCCTTGGTCAGG-3' (Exon 7)	300 nM
	FAM-5'- TTTCAACCAGCAAGCTTGCGACCTTGA -3'-TAMRA	200 nM
mHPRT-1	5'-ATCATTATGCCGAGGATTTGGAA -3' (Exon 3)	300 nM
	5'-TTGAGCACACAGAGGGCCA -3' (Exon 4)	300 nM
	FAM-5'-TGGACAGGACTGAAAGACTTGCTCGAGATG -3'-TAMRA	200 nM
huIL-22	5'-ACAACACAGACGTTCTCTCATTG -3' (Exon 2)	300 nM
	5'-GAACAGCACTTCTTCAAGGGTGA -3' (Exon 3)	300 nM
	FAM-5'-TTCCACGGAGTCAGTATGAGTGAGCGCT -3'-TAMRA	200 nM
mIL-22	5'-CAAACCTCAGCAATCAGCTCAGCT -3' (Exon 2)	900 nM
	5'-AGCCTTCTGACATTCTTCTGGATG -3' (Exon 3)	900 nM
	FAM-5'-CTGTCACATCAGCGGTGACGACCAG-3'-TAMRA	200 nM
huIL-22BP	5'-ACTGGCAACAGCAGTGTCTATTTT -3' (Exon 2)	50 nM
	5'-CTTGAGTACCCCAACAGTCTTCTTT-3' (Exon 3)	900 nM
	FAM-5'-TGCAGTACAAAATATATGGACAGAGACAATGGAAAAA -3'-TAMRA	200 nM
mIL-22BP	5'-ACAGAGTTTTTACAATCAACAATTCA -3' (Exon 2)	900 nM
	5'-TCAGACCTTCAATTTCAACAGCTC-3' (Exon 3)	300 nM
	FAM-5'-TGAGTTCCTTCATAGGCTTTTTGCTCCTTCTCT -3'-TAMRA	200 nM

### 2.4.3 Verbrauchsmaterialien

Dispergierer OmniTip® Hard Tissue	Süd-Laborbedarf GmbH, Gauting
MicroAmp® Optical Caps, PCR-Gefäßdeckel	Applied Biosystems, Weiterstadt
MicroAmp® Optical Tubes, PCR-Gefäße	Applied Biosystems, Weiterstadt
Reaktionsgefäße (2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml) steril, DNase-/RNase-frei	Eppendorf, Hamburg

### 2.4.4 Geräte

ABI Prism® 7700 Sequence Detector	Applied Biosystems, Weiterstadt
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Waldbronn
Gene Amp® PCR-System 9700, Thermocycler	Applied Biosystems, Weiterstadt
Minishaker MS2, Schüttler	IKA-Werke GmbH & Co KG, Staufen
Thermomixer comfort, Heizblock	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge Multifuge® 3 S-R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg

## 2.5 ELISA und ELISA-basierende Methoden

### 2.5.1 ELISA-Kits

Quantikine® huIL-22 ELISA-Kit	R&D Systems, Wiesbaden
Quantikine® huIFN- $\gamma$ ELISA-Kit	R&D Systems, Wiesbaden
Quantikine® huIL-17A ELISA-Kit	R&D Systems, Wiesbaden
Quantikine® huMMP1 ELISA-Kit	R&D Systems, Wiesbaden
mLBP ELISA-Kit	HyCult Biotechnology, Uden, Niederlande

### 2.5.2 Immulite®-Reagenzien

huIL-1 $\beta$ Immulite® Assay	DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim
huTNF- $\alpha$ Immulite® Assay	DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim
huLBP Immulite® Assay	DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim

### 2.5.3 Geräte

Immulinite <sup>®</sup> , automatisiertes Festphasen-Chemilumineszenz-Meßgerät	DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim
Zentrifuge Hermle Z160M	neoLab, Heidelberg
SpectraMax 340PC <sup>384</sup>	Molecular Devices, Ismaning

## 2.6 Oberflächenplasmonresonanz

### 2.6.1 Puffer und Pufferzusätze

HBS-EP Laufpuffer	GE Healthcare, Freiburg
Natrium-Acetat-Puffer, 10 mM, pH 4,5	GE Healthcare, Freiburg
Glycin-HCl, 10 mM, pH 2,0	GE Healthcare, Freiburg

### 2.6.2 Reagenzien und Kits

Amine Coupling Kit	GE Healthcare, Freiburg
--------------------	-------------------------

### 2.6.3 Rekombinante Zytokine, Antikörper, lösliche Rezeptoren

rhIL-22 FBS-frei	R&D Systems, Wiesbaden
rhIL-29 FBS-frei	R&D Systems, Wiesbaden
rhIL-22BP <sub>2</sub> -Fc-Chimer	R&D Systems, Wiesbaden
rhIL-20R1 <sub>2</sub> -Fc-Chimer	R&D Systems, Wiesbaden
Anti-huIL-22BP-pAk, Ziege	R&D Systems, Wiesbaden

### 2.6.4 Verbrauchsmaterialien

CM5 Sensor Chip	GE Healthcare, Freiburg
-----------------	-------------------------

### 2.6.5 Geräte

Biacore X mit assoziierter Software	GE Healthcare, Freiburg
Biacore X Version 2.2, BiaEvaluation	



Version 3.2

Minishaker MS2, Schüttler

IKA-Werke GmbH & Co KG, Staufen

## 2.7 Biologisches Material

### 2.7.1 Mäuse

Balb/c Mäuse, weiblich

Charles River, Wilmington, USA

Balb/c Mäuse, männlich

Charles River, Wilmington, USA

### 2.7.2 Patientenmaterial

Hautbiopsien von Patienten mit Psoriasis vulgaris

Charité – Universitätsmedizin Berlin

Hautbiopsien von gesunden Kontrollprobanden

Charité – Universitätsmedizin Berlin

Blut von Patienten mit Psoriasis vulgaris

Charité – Universitätsmedizin Berlin

Blut von Patienten mit Morbus Crohn

Charité – Universitätsmedizin Berlin

Blut von gesunden Kontrollprobanden

Charité – Universitätsmedizin Berlin

### 2.7.3 Verbrauchsmaterialien

Biopsiestanze, 5mm

PFM, Köln

### 2.7.4 Reagenzien

DSS, 36000 g/Mol

MP Biomedicals, Illkich, Frankreich

Lipopolysaccharid

Sigma-Aldrich, Taufkirchen

(*Escherichia coli* [E.coli] 0111:B4)

rmlL-22

R&D Systems, Wiesbaden

### 3 METHODEN

#### 3.1 Zellkultur

##### 3.1.1 Isolation und Stimulation von PBMC

Venöses Blut gesunder Spender, die in den zurückliegenden 48 h keinen Alkohol zu sich genommen hatten, wurde in 10 ml Citrat-Monovetten abgenommen. Die Isolation der PBMC erfolgte mittels Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll-Paque™ Plus. Dazu wurde 15 ml Ficoll durch Zentrifugation bei 400 g für 30 Sn unter den Filter des Separationsröhrchens (LeucoSep®) geschichtet. Anschließend wurden 15 ml PBS und das Blutvolumen aus zwei Citrat-Monovetten auf den Filter gegeben und bei 390 g für 40 min zentrifugiert. Die Auftrennung der einzelnen Zellpopulationen beruht hierbei auf Unterschieden in deren Größe und Dichte. Erythrozyten und Granulozyten passieren aufgrund ihres höheren spezifischen Gewichtes von  $>1,077$  g/ml gegenüber dem Trennmedium Ficoll den Gradienten und sedimentieren auf dem Boden des Röhrchens, wohingegen PBMC (Lymphozyten und Monozyten) sich aufgrund ihres geringeren spezifischen Gewichtes an der Phasengrenze zwischen Plasma und Ficoll in Form eines typischen abgegrenzten Ringes sammeln. Nach Entfernen der Plasmaschicht mit den darin enthaltenen Thrombozyten wurde die PBMC-reiche Phase in 50 ml Polypropylen-Röhrchen gesammelt, mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und durch 10-minütige Zentrifugation bei 210 g gewaschen. Es folgte ein zweiter Waschschrift für 10 min bei 200 g. Die gewonnenen Zellen wurden in RPMI Zellkulturmedium, supplementiert mit 10% FBS und 2 mM L-Glutamin, aufgenommen. Die Lebendzellzahl wurde durch Auszählung aller nicht gefärbten Zellen einer 1:10-Verdünnung mit 0,04%-iger Trypanblaulösung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die dabei gezählten Zellen pro Gruppenquadrat entsprechen  $n \cdot 10^5$  Zellen/ml. Die Kultur von  $1 \cdot 10^6$  Zellen/ml bei  $0,5 \text{ ml/cm}^2$  Kulturfläche erfolgte in feuchter Atmosphäre bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$ . Die Stimulation der Zellen erfolgte durch An- oder Abwesenheit (Kontrolle) von LPS (100 ng/ml), hitzeinaktivierte SAC (0,001% (w/v), IL-2 (10 ng/ml), IL-12 (10 ng/ml), IL-2/IL-12 (jeweils 10 ng/ml), Anti-CD3-Ak immobilisiert auf die Zellkulturoberfläche ( $1 \text{ } \mu\text{g/cm}^2$ ) oder Anti-CD3-Ak/Anti-CD28-Ak immobilisiert auf die Zellkulturoberfläche (jeweils  $1 \text{ } \mu\text{g/cm}^2$ ) in Zellkulturplatten mit 24 Gefäßen für 24, 48 und 72 h (Gewinnung von Zellkulturüberständen) oder in Zellkulturplatten mit 48 Gefäßen für 24 h (durchflußzytometrische Analyse).

### 3.1.2 Kultur und Stimulation von primären humanen Keratinozyten

Primäre humane Keratinozyten (NHEK) wurden zu  $1 \cdot 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup> in Keratinozyten-Wachstumsmedium in T75-Zellkulturflaschen in feuchter Atmosphäre bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Kulturmedium wurde alle 48 h gewechselt. Keratinozyten sind adhärenente in Monolayern wachsende Zellen. Zum Ablösen der Zellen wurden diese bei Erreichen von 70-80% Konfluenz mittels 5 ml Trypsin / EDTA-Stammlösung der Firma Lonza bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 5 min inkubiert. Die anschließende Inaktivierung der Trypsinwirkung erfolgte durch Zugabe von 5 ml Trypsin-Neutralisierungslösung und nachfolgender Zentrifugation für 5 min bei 200 g. Die pankreatitische Serin-Protease Trypsin spaltet spezifisch Peptidbindungen zwischen den basischen AS Arginin oder Lysin und einer weiteren AS was zu einer Degradation von Oberflächen-Adhäsionsproteinen führt. EDTA fördert die Ablösung der Zellen durch Entzug von Ca<sup>2+</sup>, welches für die Adhäsion wichtig ist. Die Lebendzellzahl wurde durch Auszählung aller in einer 1:2-Verdünnung in 0,04% Trypanblaulösung ungefärbten Zellen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt, wobei die gezählten Zellen pro Gruppenquadrat  $n \cdot 2 \cdot 10^4$  Zellen/ml entsprechen. Nach Einsaat in Zellkulturplatten mit 24 Gefäßen (Gewinnung von Zellkulturüberständen) oder mit 6 Gefäßen (Genexpressionsanalyse) bzw. in T75-Zellkulturflaschen (Westernblot-Analyse) erfolgte eine Vorkultur für 24 h. Für die Genexpressionsanalyse mittels Genexpressionsarray und die Signaltransduktionsanalyse wurden die Zellen nach einer weiteren 24-stündigen stimulationsfreien Kultur und einem anschließenden Wechsel des Kulturmediums mit und ohne (Kontrolle) 10 ng/ml rhIL-22 oder rhIFN- $\gamma$  für 42 h (Genexpressionsarray) oder für 10, 20 und 40 min (Western Blot) stimuliert und anschließend Zelllysate gewonnen. Für alle weiteren Genexpressionsanalysen mittels qPCR und die Gewinnung von Zellkulturüberständen wurden die Zellen nach einem Wechsel des Kulturmediums mit oder ohne (Kontrolle) je 10 ng/ml rhIL-22, rhIFN- $\gamma$ , rhIL-4, rhIL-1 $\beta$ , rhTGF $\beta$  oder einer Kombination von je 10 ng/ml rhIL-22 mit rhIL-1 $\beta$ , rhIFN- $\gamma$  oder rhIL-4 für 2, 6, 18, 42 h stimuliert und anschließend die Zellkulturüberstände oder Lysate gewonnen. Die Stimulation der Zellen erfolgte teilweise in An- oder Abwesenheit von Actinomycin D (ActD) (0,25  $\mu$ g/ml), Cycloheximid (CHX) (1  $\mu$ g/ml), Brefeldin A (Bref A) (1,25  $\mu$ g/ml), Methylamin (MA) (1 mM), Indomethacin (1  $\mu$ M), Pertussis Toxin (PTX) (100 ng/ml), TAPI-2 (50  $\mu$ M) oder mit einem entsprechenden Volumen der Lösungsmittel Ethanol (0,02%), DMSO (0,003%), bidestilliertes Wasser (0,5 %). Für die Untersuchung der Abhängigkeit der IL-22-Effekte vom Differenzierungszustand wurden die Zellen in Anwesenheit normaler (0,15 mM) oder erhöhter (1,3 mM) Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen stimuliert. Für die Untersuchung einer möglichen Synergie von IL-22 mit IL-1 $\beta$ , wurden die Zellen zunächst für 24 h mit und ohne (Kontrolle) 10 ng/ml rhIL-1 $\beta$  kultiviert. Nach dreimaligem

Waschen mit Kulturmedium erfolgte eine weitere Exposition der Zellen gegenüber Medium (Kontrolle), rhIL-1 $\beta$ , rhIL-22 oder rhIL-1 $\beta$  und rhIL-22 (je 10 ng/ml) für 24 oder 48 h.

### **3.1.3 Kultur und Stimulation von primären humanen Fibroblasten, Endothelzellen und Melanozyten**

Primäre humane dermale Fibroblasten wurden mit einer Zellzahl von  $3,5 \cdot 10^3/\text{cm}^2$  in Fibroblasten-Wachstumsmedium, primäre humane Melanozyten wurden mit einer Zellzahl von  $5 \cdot 10^3/\text{cm}^2$  in Kulturmedium 254, supplementiert mit HMGS-2, jeweils in T75-Zellkulturflaschen kultiviert. Primäre humane Endothelzellen wurden mit einer Zellzahl von  $5 \cdot 10^3/\text{cm}^2$  in Kulturmedium 131, supplementiert mit MVGS, in Attachment Faktor-beschichteten T75-Zellkulturflaschen kultiviert. Die Kultur der Zellen erfolgte in feuchter Atmosphäre bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub>, wobei das Kulturmedium jeweils nach 48 h gewechselt wurde. Zum Ablösen der dermalen Fibroblasten wurden diese bei Erreichen von 70-80% Konfluenz mittels 5 ml Trypsin / EDTA-Stammlösung der Firma Lonza bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 5 min inkubiert. Die anschließende Inaktivierung der Trypsinwirkung erfolgte durch Zugabe von 10 ml Trypsin-Neutralisierungslösung und nachfolgender Zentrifugation für 5 min bei 220 g. Zum Ablösen der Melanozyten wurden diese bei Erreichen von 80-90% Konfluenz mittels 9 ml Trypsin / EDTA-Stammlösung der Firma Invitrogen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 2 min inkubiert. Die anschließende Inaktivierung der Trypsinwirkung erfolgte durch Zugabe von 9 ml Trypsin-Neutralisierungslösung und nachfolgender Zentrifugation für 7 min bei 180 g. Zum Ablösen der Endothelzellen wurden diese bei Erreichen von 80% Konfluenz mittels 3 ml Trypsin / EDTA-Stammlösung der Firma Invitrogen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> für 7 min inkubiert. Die anschließende Inaktivierung der Trypsinwirkung erfolgte durch Zugabe von 9 ml Trypsin-Neutralisierungslösung und nachfolgender Zentrifugation für 7 min bei 180 g. Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte wie unter 3.1.2. beschrieben. Nach Einsaat in Zellkulturplatten mit 6 Gefäßen (Genexpressionsanalyse) bzw. in T75-Zellkulturflaschen (Westernblot-Analyse) erfolgte eine Vorkultur der Zellen für 24 h. Für die Westernblot-Analyse wurden die Zellen für 20 min mit und ohne (Kontrolle) rhIL-22 und rhIFN- $\gamma$  stimuliert. Für die Genexpressionsanalyse wurden die Zellen entweder sofort lysiert oder nach einer weiteren 24-stündigen stimulationsfreien Kultur und einem anschließenden Wechsel des Kulturmediums mit und ohne (Kontrolle) 10 ng/ml rhIFN- $\gamma$  und rhTNF- $\alpha$  für 24h stimuliert, anschließend gewaschen und sofort (0h) oder nach weiteren 24 oder 48 h stimulationsfreier Kultur entweder lysiert oder anschließend für 1 h mit und ohne (Kontrolle) rhIL-22 stimuliert.

### 3.1.4 Kultur und Stimulation von primären humanen Hepatozyten

Primäre humane Hepatozyten wurden mit einer Zellzahl von  $1 \cdot 10^5/\text{cm}^2$  auf BD BioCoat™ Matrigel™ Thin Layer Zellkulturplatten mit 24 Gefäßen in feuchter Atmosphäre bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte wie unter 3.1.2. beschrieben. Für eine 48-stündige Stimulationsdauer wurden primäre humane Hepatozyten der Firma Lonza mit Hepatozytenwachstumsmedium kultiviert. Für eine Stimulationsdauer von 24 bis 72 h wurden Hepatozyten der Firma BD mit HepatoSTIM Medium kultiviert. Nach einer 24-stündigen Vorkultur und anschließendem Mediumwechsel wurden die Zellen mit und ohne (Kontrolle) 10 ng/ml rhIL-22 für 24, 48 und 72 h (kinetische Analyse) oder nur für 48 h stimuliert und anschließend die Zellkulturüberstände gewonnen. Für die Untersuchung des Einflusses von IL-22 auf die Proliferation nach Stimulationsende wurde die Lebendzellzahl durch Auszählung aller adhärenenten Zellen in 4 zufällig gewählten 0,25cm<sup>2</sup> Quadraten mittels Rasterokular bestimmt, wobei die gezählten Zellen pro Gruppenquadrat einer Zellzahl von  $n \cdot 4 \cdot 10^6/\text{cm}^2$  entsprechen.

### 3.1.5 Kultur und Stimulation von HepG2-Zellen

Die Kultur von HepG2-Zellen erfolgte mit einer Zellzahl von  $5 \cdot 10^4/\text{cm}^2$  in EMEM Kulturmedium, supplementiert mit 50 ml FBS, 5 ml 200 mM L-Glutamin und 5 ml NEAA in feuchter Atmosphäre bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. HepG2 Zellen sind adhärenente Zellen, welche auf dem Boden des Kulturgefäßes inselartige Gruppen von Monolayern bilden. Zum Ablösen der Zellen wurden diese bei Erreichen von 70-80% Konfluenz mittels 5 ml Trypsin / EDTA-Stammlösung bei 37°C und 5%CO<sub>2</sub> für 5 min inkubiert. Die anschließende Inaktivierung der Trypsinwirkung erfolgte durch Zugabe von Medium ad 50 ml und nachfolgender Zentrifugation für 5 min bei 200 g. Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgte wie unter 3.1.2. beschrieben. Nach Einsaat in Zellkulturplatten mit 48 Gefäßen wurden die Zellen zunächst für 48 h vorkultiviert. Nach einem Wechsel des Kulturmediums wurden die Zellen mit und ohne (Kontrolle) 10 ng/ml rhIL-22 für 24, 48 und 72 h stimuliert und anschließend die Zellkulturüberstände gewonnen. Zur Untersuchung einer möglichen Synergie von IL-22 mit bekannten Induktoren von Akut-Phase-Proteinen erfolgte die Stimulation der Zellen in Anwesenheit von je 10 ng/ml rhIL-1β, rhIL-6, rhTNF-α, rhIL-17A oder möglicher Kombinationen dieser Zytokine für 48 h. Zur Untersuchung der Dosis-Wirkungs-Beziehung wurden die Zellen mit und ohne (Kontrolle) 25, 50 und 100 ng/ml rhIL-22, rhIL-6, rhIL-17A oder einer Kombination von je 50 ng/ml rhIL-22 und rhIL-6 oder rhIL-22 und rhIL-17A für 48 h stimuliert. Um die Spezifität des

IL-22 Effektes zu bestätigen, erfolgte die Stimulation von ruhenden oder mittels durch je 10 ng/ml rhIL-1 $\beta$ /rhTNF- $\alpha$  kostimulierten Zellen in Anwesenheit steigender Konzentrationen von Anti-IL-10R2-pAk oder IgG Kontroll-Ak (0 / 0,1/ 0,32 / 1 / 3,2 / 10  $\mu$ g/ml). Für die Untersuchung der Regulation der IL-22-Aktivität durch IL-22BP erfolgte die Stimulation von ruhenden oder mittels durch je 10 ng/ml rhIL-1 $\beta$ /rhTNF- $\alpha$  kostimulierten Zellen in Anwesenheit steigender Konzentrationen von rhIL-22BP<sub>2</sub>-Fc (0, 74, 148, 296, 592 ng/ml), welches für 2 h mit 10 ng/ml rhIL-22 bei Raumtemperatur vorinkubiert wurde.

### 3.1.6 Beschichtung von Kulturgefäßen

Für die Aktivierung von PBMC über CD3- und CD28-abhängige Stimulation und Kostimulation wurden die Kulturplatten je Vertiefung mit 1  $\mu$ g/cm<sup>2</sup> Anti-CD3-Ak oder Anti-CD28-Ak beschichtet und für 2 h bei 37°C inkubiert. Vor dem Einsatz wurden die Kavitäten zweimal mit dem Volumen an eiskaltem PBS gewaschen, welches dem späteren Kulturvolumen entspricht. Für die Kultur von Endothelzellen wurde die Oberfläche der Kulturgefäße mit 50  $\mu$ l/cm<sup>2</sup> Attachment-Faktor beschicht, für 30 min bei 37°C inkubiert und vor dem Einsatz abgesaugt.

## 3.2 Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie ist ein Verfahren zur Identifizierung und Charakterisierung von Zellen hinsichtlich ihrer Größe, Granularität und ihrer Zelloberflächenmoleküle.

Die Zellen werden hierfür mit Hilfe einer durch eine Trägerflüssigkeit erzeugten laminaren Strömung durch eine Kapillare gedrückt, so daß sie einzeln an einem Laserstrahl (488 nm Argon-Laser) vorbeigeführt werden (hydrodynamische Fokussierung), dessen Ablenkung von Photodetektoren, sogenannten Photomultipliern gemessen wird. Bei der Passage des Laserstrahls verursachen die Zellen eine Lichtstreuung, die zum einen entlang der Achse des einfallenden Lichtes (Vorwärtsstreulicht, FSC), zum anderen in einem 90° Winkel zum einfallenden Licht (Seitwärtsstreulicht, SSC) gemessen wird. Hierbei ist die Stärke der Lichtbeugung (FSC) von der Größe und die Lichtbrechung und Reflexion (SSC) von der Granularität der Zelle abhängig. Zur Unterscheidung einzelner Zellpopulationen werden FSC und SSC gegeneinander in einem Punktwolkendiagramm („Dot Blot“) aufgetragen. Mittels Fluorochrom-markierter Antikörper lassen sich weitere Subpopulationen hinsichtlich der Expression sowie der Expressionshöhe von Oberflächenmolekülen identifizieren. Fluorochrome sind komplexe Moleküle, dessen Elektronen durch Lichtenergie angeregt werden und damit auf ein höheres Energieniveau steigen. Aus

diesem instabilen Zustand fallen die Elektronen sehr schnell wieder auf ihr normales Energieniveau ab, wobei die frei werdende Energie vor allem in Form von Photonen geringerer Energie und damit größerer Wellenlänge abgegeben wird. Dieses emittierte Licht (Fluoreszenz) besitzt eine Fluorochrom-spezifische Wellenlänge, die wie das Seitwärtsstreulicht in einem Winkel von 90° zum einfallenden Licht detektiert wird. Die Intensität des emittierten Fluoreszenzlichtes korreliert hierbei mit der Anzahl gebundener Antikörper, die die Anzahl vorhandener Oberflächenmoleküle repräsentieren, gegen welche die Antikörper gerichtet sind. Nach Detektion werden die optischen Signale in elektronische Signale umgewandelt und für die Computeranalyse digitalisiert.

### 3.2.1 Zellfärbung

Die Färbung der Zellen erfolgte mit den in Tab. 2 aufgeführten Antigen-spezifischen Aks, sowie den entsprechenden Isotyp-Aks. Hierfür wurden je 1\*10<sup>5</sup> Zellen eines Zellkultur-Ansatzes in 1,2 ml Micronic-Röhrchen überführt, mit 1 ml kaltem FACS-Puffer bei 200 g und 4°C für 5 min gewaschen, mittels Vakuumpumpe auf 100 µl abgesaugt und für 15 Sn auf einem Plattenschüttler resuspendiert. Nachfolgend wurden die Proben mit je 50 µl Antikörpergemisch (Tab. 2) für 20 Minuten bei 4°C gefärbt, anschließend resuspendiert und mit 1 ml kaltem FACS-Puffer gewaschen. Nach Absaugen auf 100 µl erfolgte die sofortige Messung von je 3\*10<sup>4</sup> Zellen je Ansatz mittels FACSCalibur™. Tab. 2: Zusammensetzung der Antikörper-Gemische (Angaben pro 50 µl-Ansatz)

**Tab. 1: Zusammensetzung der Antikörper-Gemische (Angaben pro 50 µl-Ansatz)**

Ak-Mix	FITC	PE	PC5	APC
<b>1</b>	IgG1-Ak 8 µl	Anti-CD16-mAk Anti-CD56-mAk 10 µl	Anti-CD14-mAk 1,5 µl	Anti-CD3-mAk 1 µl
<b>2</b>	Anti-CD69-mAk 8 µl	Anti-CD16-mAk Anti-CD56-mAk 10 µl	Anti-CD14-mAk 1,5 µl	Anti-CD3-mAk 1 µl
<b>3</b>	IgG1-Ak 8 µl	Anti-CD8-mAk 6 µl	Anti-CD19-mAk 3 µl	Anti-CD4-mAk 3 µl
<b>4</b>	Anti-CD69-mAk 8 µl	Anti-CD8-mAk 6 µl	Anti-CD19-mAk 3 µl	Anti-CD4-mAk 3 µl

### 3.2.2 Analyse mittels Durchflußzytometrie

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des Programmes CELL Quest. Hierfür erfolgte zuerst die Auftragung der Zellen in einem Punktwolkendiagramm in der FSC-versus-SSC-Darstellung. Die Eingrenzung („Gating“) der zu analysierenden Zellen in sogenannte Regionen erfolgte basierend auf der Vitalität der Zellen (Region 1: lebende Zellen) und durch Auftragung der folgenden Parameter gegeneinander: CD14 gegen CD3 (Region 2: CD14<sup>+</sup> Monozyten), CD16/CD56 gegen CD3 (Region 3: CD3<sup>-</sup> CD16<sup>-</sup> CD56<sup>+</sup> NK-Zellen), CD19 gegen SSC (Region 4: CD19<sup>+</sup> B-Lymphozyten), CD3 gegen CD4 (Region 5: CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen) und CD3 gegen CD8 (Region 5: CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T-Zellen). Die einzelnen Zellpopulationen wurden somit als Teilmenge der Ereignisse von Region 1 und der beschriebenen Zelltyp-spezifischen Region definiert. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten der untersuchten Subpopulationen wurden in einem Histogramm dargestellt, dessen Ordinate die Anzahl der gemessenen Ereignisse und dessen Abszisse die relative Fluoreszenz wiedergibt. Zur Auswertung der Messergebnisse wurde das geometrische Mittel der gemessenen mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) verwendet.

### 3.3 Westernblot-Analyse

Die Westernblot-Analyse stellt einen immunologischen Nachweis von Proteinen dar. Hierbei werden die auf eine Trägermatrix aufgetragenen Proteine zunächst elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Trägermembran transferiert. Durch hydrophobe Wechselwirkungen werden diese auf der Trägermembran immobilisiert und können nachfolgend durch Bindung eines primären Ak, welcher für das relevante Protein spezifisch ist, identifiziert werden. Die Detektion erfolgt durch eine nachfolgende Bindung eines sekundären Ak, der gegen den primären Ak entsprechend seiner Klasse / Subklasse und der Spezies, in der dieser generiert wurde, gerichtet ist. In dieser Arbeit wurde ein mit Peroxidase gekoppelter sekundärer Ak verwendet. Die durch Peroxidase katalysierte Oxidation von Luminol, einem zyklischen Diazylhydrazid, führt hierbei zur Emission von Chemilumineszenz, welche durch die Anwesenheit von Phenol noch verstärkt wird und mittels eines Autoradiographie-Filmes (ECL-Hyperfilm) detektiert werden kann.

#### 3.3.1 Zelllyse

Die Lyse der Zellen erfolgte durch einen Triton-X-basierenden Lysepuffer. Triton-X stellt ein nichtionisches Detergenz dar, welches die Isolation von Proteinen durch Zerstörung



von Zellmembran-Protein-Komplexen und durch Hemmung der Aggregation von Proteinen fördert. Die Anwesenheit verschiedener Proteinaseinhibitoren und Phosphataseinhibitoren schützt die im Zelllysate enthaltenen Proteine vor proteolytischem Abbau durch Proteasen und vor einer Dephosphorylierung. Für die Lyse wurden die Zellen wiederholt mit kaltem PBS gewaschen und nachfolgend mit 500 µl Lysepuffer für 10 min auf Eis inkubiert, mittels Cellscraper vom Boden der Zellkulturgefäße abgelöst und in ein vorgekühltes 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt. Die Zelllysate wurden anschließend zweimal für 30 s stark gemixt, für 20 min bei 4°C und 14000 Upm zentrifugiert und die Überstände, welche die zytoplasmatischen Proteinfractionen enthalten, gewonnen. Diese wurden bei -80°C gelagert oder zur sofortigen Proteinbestimmung weiterverwendet.

### 3.3.2 Proteinquantifizierung

Die Proteinquantifizierung der Zelllysate erfolgte mittels BCA Protein Assay Kit. Diese Methode basiert auf der klassischen Reduktion von  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^{1+}$  durch Proteine im alkalischen Milieu (Biuret-Reaktion) und einer nachfolgenden Bildung wasserlöslicher farbiger Chelate aus  $\text{Cu}^{1+}$  mit je zwei Molekülen Bicinchoninsäure. Diese Chelatkomplexe weisen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 562 nm auf, wobei die Absorption mit steigender Proteinkonzentration in einem Bereich zwischen 20 bis 2000 µg/ml linear verläuft und proportional zum Proteingehalt der Probe ist. Als Proteinstandard wird eine Konzentrationsreihe einer BSA-Lösung, dessen Lösungsmittel dem Lysepuffer der Proben entspricht, verwendet. Jeweils 25 µl der Standards und der Zelllysate wurden in eine 96-Well-Platte überführt und mit 200 µl einer Lösung, bestehend aus einem Teil 4% Kupfersulfat-Lösung und 50 Teilen Bicinchoninsäure-Lösung, versetzt, für 30 min mittels Plattenschüttler resuspendiert und anschließend für 30 min bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert. Nach Abkühlen der Zellkulturplatte auf Raumtemperatur erfolgte die photometrische Messung der Absorption bei 562 nm.

### 3.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese lassen sich Proteine anhand ihres Molekulargewichtes in Proteinbanden auftrennen. Die Verwendung des anionischen Detergenz SDS beruht auf deren Eigenschaft bei hohen Temperaturen nichtkovalente Bindungen aufzulösen und Proteine zu denaturieren und ermöglicht eine von der Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine unabhängige Auftrennung. Durch die effektive Bindung eines SDS-Anions je Dipeptid verleiht SDS den Proteinen eine negative Gesamtladung,

was zusammen mit der Spaltung kovalenter Disulfidbrücken durch die Anwesenheit von Reduktionsmitteln zur Linearisierung der Proteine führt. Die Wanderung der Proteine im Gel durch Anlegen eines elektrischen Feldes basiert hierbei darauf, daß größere Moleküle aufgrund höherer Reibungskräfte langsamer wandern als kleinere. Die Schätzung des Molekulargewichtes der Proteinbanden erfolgt dabei anhand eines Proteinmarkers. Für die Gelelektrophorese wurden je Ansatz 20 µl Zellysat mit 7,5 µl 4x LDS Proben-Puffer und 2,5 µl 10x reduzierendes Agenz versetzt und für 5 min bei 95°C inkubiert. Als Proteinmarker wurden der MagicMark XP™ Western-Standard und der SeaBlue® Proteinstandard in einer Mischung zu gleichen Teilen verwendet. Die Probenauftragung erfolgte nach dem Einhängen des Gels in die Gelelektrophorese-Kammer und einer nachfolgenden Befüllung der mittleren Kammer mit 200 ml 1x SDS Laufpuffer und 1 ml Antioxidant. Die äußere Kammer wurde mit 600 ml 1x SDS Laufpuffer gefüllt. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 200 V für 35 min.

#### 3.3.4 Blotting

Das Blotting vermittelt den horizontalen Transfer der in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennten Proteine aus dem Gel auf eine Membran im elektrischen Feld. Für das Blotting wurde auf eine Seite des Gels ein Filterpapier und auf die andere Seite eine Nitrozellulosemembran und darüber ein weiteres Filterpapier platziert. Sowohl Filterpapier, als auch Nitrozellulosemembran wurden vor Gebrauch in Transfer-Puffer vorinkubiert. Das so vorbereitete Sandwich wurde von beiden Seiten mit drei in Transfer-Puffer vorinkubierten Schwämmen versehen und so in die Blotting-Kammer eingelegt, daß eine Wanderung der Proteine zur Anode ermöglicht wird. Das Blotting erfolgte nach Einhängen des Blotting-Moduls, dessen Auffüllen mit Transfer-Puffer und einem Befüllen der beiden äußeren Kammern mit Aqua dest. bei 30 V und 170 mA für 1 h.

#### 3.3.5 Immunnachweis

Die Protein-beladene Nitrozellulosemembran wurde für 5 min in 1x TBST-Puffer gewaschen und anschließend zum Abblocken freier Bindungsstellen mit 5% Milchpulver in TBST für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgte nach drei weiteren Waschschritten für je 5 min in 1x TBST eine Inkubation der Membran über Nacht bei 4°C mit einem primären Kaninchen Anti-hu-pAk (polyklonaler Antikörper) in einer Verdünnung von 1:1000 (Anti-P-STAT1, Anti-P-STAT3, Anti-P-STAT5, Anti-STAT3, Anti-P-p38, Anti-

P-JNK, Anti-P-Erk1/2, Anti-P-I $\kappa$ B- $\alpha$ , Anti-I $\kappa$ B- $\alpha$ ). Die Inkubation mit dem sekundären Ziege Anti-Kaninchen-mAk erfolgte in einer 1:4000 Verdünnung in Block-Puffer für 1 h bei Raumtemperatur nach drei Waschschritten für je 5 min in TBST-Puffer. Alle Inkubations- und Waschrinne erfolgten schüttelnd bei 35 Upm.

### 3.3.6 Signalentwicklung

Nach weiteren drei Waschschritten für je 5 min in TBST-Puffer wurde die Nitrozellulosemembran für 1 min mit 5 ml ECL inkubiert. Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte mittels ECL-Hyperfilm in einer Filmkassette. Der belichtete Film wurde durch Schwenken in Entwicklerlösung und darauf folgend in einer Fixierlösung entwickelt.

## 3.4 Genexpressionsanalyse

### 3.4.1 RNA-Isolierung

Für die Genexpressionsanalyse wurde aus den zu analysierenden Zellen die Gesamt-RNA isoliert. Dazu erfolgte die Lyse von ca.  $10^6$  Zellen mit 500  $\mu$ l der Lyselösung des InViSorb<sup>®</sup> RNA-Kits II. Gewebeproben wurden während des Auftauens in 700  $\mu$ l Lysepuffer mittels Gewebehomogenisator aufgeschlossen und anschließend für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellysate wurden bei -80 °C gelagert.

Murine Gewebelysate wurden vor RNA-Isolation für 1 h mit 4 mg/ml Proteinase K bei Raumtemperatur behandelt, um inhibitorische Proteine zu eliminieren. Die RNA-Isolation mit dem InViSorb<sup>®</sup> RNA Kit II basiert auf der klassischen Phenol-Chloroform-Extraktion mit einer zusätzlichen Entfernung genomischer DNA durch Bindung an Adsorbin, einen mineralischen Träger. Nach Zugabe von 30  $\mu$ l Adsorbin und kurzem Mixen erfolgte eine Inkubation des Lyseansatzes für 5 min auf Eis. Anschließend wurde das Adsorbin mit der gebundenen genomischen DNA durch Zentrifugation bei 20800 g für 1 min pelletiert und der gewonnene Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Es folgte die Zugabe von 500  $\mu$ l Phenol, 100  $\mu$ l Chloroform und 50  $\mu$ l Puffer A. Durch den sich anschließenden Zentrifugationsschritt für 10 min bei 20800 g wurde eine Phasentrennung erreicht, wobei die untere, organische Phase aus Proteinen, Lipiden und aufgrund der mittels des Puffer A erreichten Ansäuerung des Phenols aus genomischer DNA besteht. Nach Überführen der wässrigen RNA-haltigen Phase in ein neues Reaktionsgefäß und einer Zugabe von 40  $\mu$ g Glykogen als Fällungshilfe erfolgte die Fällung der RNA für 30 min bei -20 °C.

Überschüssige Salze wurden anschließend durch zweimaliges Waschen mit je 1 ml eiskaltem 75%igem Ethanol (5 min bei 20800 g) entfernt. Es folgte die Trocknung des Pellets für 2 min bei 60°C und eine anschließende Rehydrierung in 30 µl DNase-/RNase-freiem Wasser. Die Bestimmung der Qualität und Quantität der isolierten RNA erfolgte mittels elektrophoretischer Auftrennung der RNA-Moleküle innerhalb eines RNA-Analysechips mit dem Agilent 2100 Bioanalyser, wobei die Gesamt-RNA-Konzentration als Summe der ribosomalen 18S- und 28S-RNA, deren Menge proportional zur isolierten „messenger“ RNA (mRNA) ist, in Bezug zu einem Standard (RNA 6000 Ladder) berechnet wird.

### 3.4.2 cDNA-Synthese

Für die Analyse der Genexpression mittels Polymerase-Kettenreaktion mit revers transkribierter mRNA (RT-PCR) ist zunächst die Umschreibung der isolierten RNA in komplementäre „complementary“ DNA (cDNA) notwendig, da die für die PCR-Reaktion verwendete *Taq*-Polymerase eine DNA-abhängige DNA-Polymerase darstellt. Die cDNA-Synthese erfolgt durch eine komplementäre Bindung von Startmolekülen, kurzen DNA-Sequenzen, welche als „Primer“ bezeichnet werden (Vorwärtsprimer und Rückwärtsprimer), an die mRNA, der Anlagerung einer reversen Transkriptase an den Matrizenstrang und dem nachfolgenden Synthesestart. Die hier verwendeten Primer stellen ein Gemisch aus 12 bis 18 Bp langen Polydesoxythymidinen („Oligo d(T)-Primer“) dar, welche komplementär am 3'-Ende der vorhandenen Poly-A-Enden der mRNA-Spezies binden, um eine selektive Umschreibung von mRNA in cDNA zu erreichen. Für die reverse Transkription wurde eine aus dem Moloney-Maus-Leukämie-Virus (MMLV) stammende RNA-abhängige DNA-Polymerase (MMLV-RT) verwendet. Zunächst wurde die mRNA (Endkonzentration im Gesamt-Synthese-Ansatz: 0,05 µg/ml) für 5 min bei 75°C mit 0,005 µg/ml Oligo d(T)<sub>12-18</sub> inkubiert, durch anschließende Inkubation für 5 min auf Eis abgekühlt und mit Enzym-spezifischem Puffer (First Strand Buffer), 10 mM Dithiothreitol, 250 µM jedes der vier Desoxynukleotidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 1 Einheit/ml des Ribonuklease-Inhibitors RNasin und 5 Einheiten/ml MMLV-RT versetzt. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte die cDNA-Synthese bei 42°C für 60 min in einem Thermo-Cycler mit einem anschließenden Abstoppen der Reaktion durch eine 5-minütige Hitzedenaturierung des Enzyms bei 95°C.

### 3.4.3 TaqMan-PCR

Die TaqMan<sup>TM</sup>-PCR ist eine quantitative „real time“-RT-PCR-Methode (qPCR). Entgegen

der konventionellen PCR werden die durch Anlagerung von Zielsequenz-spezifischen Primern (Vorwärtsprimer und Rückwärtsprimer) an die durch Hitzedenaturierung gebildete einzelsträngige cDNA entstehenden spezifischen PCR-Produkte unter Verwendung einer Fluoreszenz-markierten DNA-Sonde verfolgt, die komplementär zur Zielsequenz ist. Die verwendete DNA-Sonde ist am 5'-Ende an einen Reporterfarbstoff (6-Carboxy-Fluorescein, FAM) und am 3'-Ende an einen Quencherfarbstoff (6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin, TAMRA) gebunden, wobei die Nähe der Farbstoffe zueinander zu einer Unterdrückung der Fluoreszenz des Reporterfarbstoffes führt. Während der PCR-Reaktion wird der Reporterfarbstoff durch die Fähigkeit der verwendeten Polymerase neben der DNA-Synthese auch DNA abzubauen (5'-3'-Exonukleaseaktivität) von der DNA-Sonde „abgeschnitten“, wodurch die Nähe zum Quencherfarbstoff zerstört wird und Fluoreszenz frei wird. Das Fluoreszenzsignal steigt somit bei jedem Amplifikationszyklus proportional zur Amplifikation der Zielsequenz.

Zur Bestimmung von huS100A7, huS100A8, huS100A9, huCALML5, huDSC1, huKRT10, huMMP1, huIFN- $\gamma$ , huIL-1 $\beta$ , huLBP, mS100A8, mS100A9, mMMP1, mIFN- $\gamma$ , mL17A, mL17F, mLBP, und der Referenzgene hu Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase 1 (HPRT) und mHPRT mittels TaqMan™-PCR wurden in einem 25  $\mu$ l-Ansatz (pro Reaktionsgefäß) 11,25  $\mu$ l einer cDNA-Verdünnung (1:10,25 in DNase-/RNase-freiem Wasser) mit 13,75  $\mu$ l PCR-Mix, bestehend aus dem TaqMan™ Universal PCR Mastermix, der jeweiligen Sonde und den zielgenspezifischen 3'- und 5'-Primern (Assay on Demand der Firma Applied Biosystems) versetzt. Zur Bestimmung von huIL-22, huIL-22BP, mL-22, mL-22BP und der Referenzgene hHPRT und mHPRT wurden in einem 25  $\mu$ l-Ansatz (pro Reaktionsgefäß) 1  $\mu$ l einer cDNA-Verdünnung (1:5 in DNase- / RNase-freiem Wasser) mit 20  $\mu$ l PCR-Mix, bestehend aus dem TaqMan™ Universal PCR Mastermix sowie der jeweiligen Sonde und zielgenspezifischen 3'- und 5'-Primern (Sequenzen und Konzentration der synthetischen Oligonukleotide siehe unter 2.4.2 Tab. 2) versetzt. Der TaqMan™ Universal PCR Mastermix enthält eine Polymerase, dessen Aktivität bei Raumtemperatur blockiert ist (AmpliAq Gold® Polymerase), die dNTPs (dATP, dCTP, dGTP und - anstelle von dTTP - dUTP), eine für die Polymerase und die Sondenstruktur geeignete MgCl<sub>2</sub>-Konzentration und bietet durch die Uracil-N-Glycosylase AmpErase® einen Schutz vor Kontaminationen durch bereits vorhandene TaqMan™-PCR-Produkte. Zunächst wurde der Ansatz zur Aktivierung der Uracil-N-Glycosylase für 2 min bei 50 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine 10-minütige Inkubation bei 95 °C zur Inaktivierung der Uracil-N-Glycosylase und der Zerstörung von deren Abbauprodukten, sowie einer irreversiblen Aktivierung der Polymerase. Es folgte eine Zwei-Schritt-PCR, wobei der erste Schritt die Trennung der DNA-Doppelstränge durch Hitzedenaturierung bei 95 °C für 15 s und der zweite Schritt die Hybridisierung der Sonde und anschließend der

Primer an die einzelsträngige DNA durch Abkühlung auf 60 °C, sowie die Neusynthese des Doppelstrangs (kombinierter Hybridisierungs- Elongations-Schritt) während 1 min beinhaltet. Durch eine zyklische Wiederholung (45 Zyklen) von Denaturierung und Hybridisierung/Elongation wird eine exponentielle Amplifikation der Zielsequenz erreicht. Die Amplifikation der zu analysierenden cDNA-Spezies erfolgte parallel zum Referenzgen HPRT jeweils als Dreifachbestimmung im ABI Prism® 7700 Sequence Detector mit assoziierter Software SDS Version 1.6.3. Die Bestimmung der Expression relativ zum Referenzgen HPRT erfolgte mit Hilfe des  $\Delta C_t$  Wertes, der Differenz zwischen der Schwellen-Zyklenzahl des zu quantifizierenden Gens und der des Referenzgens, als  $2^{-\Delta C_t}$ .

#### 3.4.4 cDNA-Microarray-Analyse

Die Analyse cDNA-Microarray-basierter Genexpressionsprofile IL-22- und IFN- $\gamma$ -behandelter primärer humaner Keratinozyten erfolgte mittels PIQOR™ SkinPatho Microarray durch die Firma Memorec Biotec gemäß den Vorgaben des Herstellers. Der PIQOR™ SkinPatho Microarray umfasst 1126 Oligonukleotide, welche spezifisch für Genprodukte, welche bei der Inflammation, Proliferation, Differenzierung, Apoptose, Metabolismus, Struktur, Signaltransduktion, Adhäsion, Mobilität und Migration in der Haut eine Rolle spielen, beinhaltet. Dazu wurde, wie unter 3.4.1 beschrieben, die Gesamt-RNA der Zellen isoliert und deren Qualität und Quantität bestimmt. Nachfolgend wurden 1  $\mu$ g Gesamt-RNA durch die Firma Memorec Biotec mit einem T7-Polymerase-basierenden Protokoll linear amplifiziert, anschließend nochmals quantifiziert und auf Integrität überprüft und nachfolgend während der reversen Transkription durch Inkorporation der fluoreszierenden Desoxycytosintriphosphate Cy3-dCTP (Kontroll-Probe) oder Cy5-dCTP (IL-22-, IFN- $\gamma$ -behandelte Proben) markiert und simultan auf einen PIQOR™ SkinPatho Microarray hybridisiert. Die Quantifizierung des Fluoreszenzsignals und die Kalkulation der Cy5/Cy3 Ratio Signalintensität erfolgte mittels entsprechender Software durch die Firma Memorec Biotec.

### 3.5 ELISA und ELISA-basierende Methoden

ELISA ist eine auf einer enzymatischen Farbreaktion basierende immunologische Nachweis- und Quantifizierungsmethode. Grundlage des für die Quantifizierung von huIL-22, huIFN- $\gamma$ , huIL-17A und mLBP angewandten Sandwich-Prinzips bildet die Einbindung des zu quantifizierenden Moleküls zwischen zwei gegen verschiedene Epitope gerichtete und sich gegenseitig nicht in ihren Bindungseigenschaften

beeinflussende Antikörper. Der Auffang-Antikörper liegt auf einer Plastikoberfläche in den Reaktionsgefäßen einer 96-Loch-Mikrotiterplatte immobilisiert vor und bindet nach Zugabe der zu untersuchenden Probe darin vorhandene Antigene. Nachfolgend kann der chemisch mit einem Enzym gekoppelte Detektionsantikörper ebenfalls an die spezifischen Antigene binden, wodurch die enzymatische Umsetzung eines farblosen Substrates in ein farbiges Produkt im Reaktionsgefäß erfolgen kann. Liegt kein Antigen gebunden an den Auffang-Antikörper vor, wird der Detektionsantikörper durch Auswaschen entfernt. Die Umsetzung der Chromogenvorstufe zum Chromogen wird direkt in der Kavität der Mikrotiterplatte mittels Spektralphotometrie bei der entsprechenden Wellenlänge quantifiziert. Die optische Dichte des Chromogens ist dabei proportional zur Anzahl der gebundenen Antigen-Moleküle. Der Nachweis von huTNF- $\alpha$ , huIL-1 $\beta$  und huLBP erfolgte durch ein abgewandeltes vollautomatisches Chemolumineszenz-Verfahren mit dem Immulite®-System. Hier fungiert eine mit spezifischen Antikörpern beschichtete Polystyrolkugel als Bestandteil eines Teströhrchens als Festphase. Dabei konkurriert das in der Probe enthaltene nachzuweisende Antigen mit dem im Reagenz enthaltenen Enzym-markierten Antigen um Bindungsstellen der Antikörper. Ungebundene Substanzen werden in dem Teströhrchen mittels Zentrifugal-Waschtechnik entfernt. Die Umsetzung eines Chemilumineszenz-Substrates (p-Phenyldiamin) durch gebundenes Enzym löst Lichtemission aus, deren Intensität umgekehrt proportional zur Konzentration der nachzuweisenden Substanz ist.

### **3.5.1 Nachweis von IL-22, IFN- $\gamma$ , IL-17A und mLBP**

Die Detektion von huIL-22, huIFN- $\gamma$ , huIL-17A und mLBP erfolgte mit den entsprechenden ELISA-Kits gemäß den Vorgaben des Herstellers. Dabei wurden die Zellkulturüberstände für die 24 h-Werte unverdünnt und für die 48 h- und 72 h-Werte entweder unverdünnt (Zellkulturen behandelt mit Medium, LPS, SAC, IL-2) oder 1:5 verdünnt (Zellkulturen behandelt mit IL-2/IL-12, Anti-CD3-Ak, Anti-CD3/Anti-CD28-Ak) eingesetzt. Für die Quantifizierung von mLBP wurde murines EDTA-Plasma in einer Verdünnung von 1:1000 eingesetzt.

### **3.5.2 Nachweis von TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ und huLBP**

Die Detektion von huTNF- $\alpha$ , huIL-1 $\beta$  und huLBP erfolgte mit den entsprechenden Immulite®-Assays gemäß den Vorgaben des Herstellers.

### 3.6 Oberflächenplasmonresonanz

Die Oberflächenplasmonresonanz („surface plasmon resonance“, SPR)-Analyse mittels BIACORE® ist eine Methode zur Analyse von Interaktionen zwischen biologisch aktiven Molekülen in Echtzeit. SPR ist ein optisches Phänomen, welches bei der Totalreflektion an zwei Schichten mit unterschiedlichem Brechungsindex auftritt. Hierbei wird das aus dem Medium mit dem höheren Brechungsindex ausfallende Licht teilweise reflektiert und teilweise gebrochen. Ist der Einfallswinkel größer als der kritische Winkel der Totalreflektion, einem Grenzwinkel, welcher von den Brechungsindizes beider Medien abhängig ist ( $\sin \alpha_{\text{GRENZ}} = n_{\text{Medium2}}/n_{\text{Medium1}}$ ), erfolgt eine Totalreflektion. Trotz der Totalreflektion des einfallenden Lichtes entsteht an der Grenzfläche beider Schichten eine evaneszente Welle, welche sich in das Medium mit dem kleineren Brechungsindex ausbreitet. Ist die Grenzschicht der Medien von einer hauchdünnen Metallschicht bedeckt und das einfallende Licht monochromatisch und linear polarisiert, so regt die evaneszente Welle delokalisierte Oberflächenenergiequanten („Oberflächenplasmonen“, Plasmaschwingungsquanten) in der Metallschicht an, wodurch die Intensität des reflektierten Lichtes an einem bestimmten kritischen Winkel (Resonanzwinkel) deutlich reduziert ist, was zu einem scharfen Schatten auf der Seite des reflektierten Strahles führt. Hierbei stellt der Einfallswinkel, bei welchem der Schatten zu beobachten ist, den Resonanzwinkel dar, welcher vom Brechungsindex des Mediums abhängig ist, in welches die evaneszente Welle eintritt. Da der Brechungsindex des Mediums durch die Oberflächenkonzentration aufgelagerter Substanzen verändert wird, lassen sich Änderungen in deren Konzentration direkt durch Änderungen des Resonanzwinkels (Resonanzsignal) ableiten. Dieses wird hierbei in sogenannten Resonanzeinheiten ausgegeben, wobei 1000 RU einer Änderung des Resonanzwinkels um  $0,1^\circ$  und einer Änderung der Oberflächenprotein-Konzentration von ca.  $1 \text{ ng/mm}^2$  entsprechen.

#### 3.6.1 BIACORE® Technologie

BIA (biomolekulare Interaktionsanalyse) nutzt das Phänomen der SPR. Zu den essentiellen Komponenten des analytischen BIACORE®-Systems gehören der Sensorchip, ein Flüssigkeitsstromsystem und das optische System. Der Sensorchip stellt einen mit einer 56 nm dünnen Goldschicht und einer über einen kovalent verknüpften  $\omega$ -Hydroxyalkanethiol-Monolayer aufgelagerten dünnen Matrixschicht bestehenden Glaträger dar. Für die kovalente Kopplung von Proteinen auf die Sensorchipoberfläche eignet sich besonders eine Matrix aus carboxymethyliertem Dextran (CM-Dextran). Die Immobilisierung von Proteinen an CM-Dextran Sensorchips (CM5 Sensorchips) kann



hierbei durch eine Kopplung über deren Amin-, Thiol-, Aldehyd-, Carboxylreste erfolgen. Das Flüssigkeitsstromsystem stellt die kontrollierte Bereitstellung von Puffer und Probe zur Sensorchip-Oberfläche sicher und mündet in einer der Sensorchip-Oberfläche aufliegenden Flüssigkeitsstromkassette, welche den direkten Kontakt zwischen Sensorchip-Oberfläche und Flüssigkeit gewährleistet. Das optische System umfasst die Lichtquelle, welche aus einer hocheffizienten und nahe dem Infrarotbereich Licht aussendenden Diode besteht, sowie einer festen Anordnung von Licht-sensitiven Dioden, welche die Gesamtheit des reflektierten Lichtes und somit des Resonanzsignales aufnehmen. Die automatische Ausgabe der Kalkulation der Änderung des Resonanzwinkels erfolgt als Resonanzeinheiten („*Resonance Unit*“, RU) mittels assoziierter Computersoftware.

### 3.6.2 Immobilisierung

Die Immobilisierung von Protein erfolgte auf die Oberfläche von CM5 Sensorchips mittels Amin-Kopplung gemäß den Vorgaben des Herstellers bei einer Flußrate von 5 µl/min in 10 mM Natriumacetat-Puffer (pH 4.5). Diese Kopplungsmethode basiert auf der Bildung von Succinimidestern der freien Carboxylgruppen der Dextranmatrix mit einem Gemisch von 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl)-carbodiimid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS). Diese Ester sind in der Lage spontan mit Aminogruppen der Proteine zu reagieren, wobei eine kovalente Verknüpfung von Protein mit Dextran über eine neue Esterbindung entsteht. Zunächst wurde die Oberfläche durch Injektion von 35 µl eines 1:1 Gemisches von EDC (0,4 M) und NHS (0,1 M) aktiviert. Danach erfolgte die kovalente Bindung von 25 µg/ml rhIL-22 für 20 min (Affinität im Gleichgewichtszustand), von 5 µg/ml rhIL-22 für 12 min (Analyse der kinetik-Ratenkonstanten), von 25 µg/ml rhIL-29 für 14 min (Affinität im Gleichgewichtszustand), von 5 µg/ml rhIL-29 für 4 min (Analyse der Kinetik-Ratenkonstanten) oder von 5 µg/ml rhIL-22BP<sub>2</sub>-Fc und rhIL-20R1<sub>2</sub>-Fc für 37 min bzw. 9 min (Analyse der kinetik-Ratenkonstanten). Hierbei wurde das zu analysierende Protein auf die Sensorchip-Oberfläche der zweiten Flusszelle (IL-22 or IL-22BP) und das Kontrollprotein auf die Sensorchip-Oberfläche der ersten Flusszelle (IL-29 or IL-20R1) immobilisiert (Referenzzelle). Verbleibende aktive Succinimidester wurden nachfolgend durch eine Injektion von 35 µl 1 M Ethanolamin-HCL pH 8,5 inaktiviert. Die erreichten Ligandendichten nach Immobilisierung betrugen 2954 RU für IL-22 und 2257 RU für IL-29 (Affinität im Gleichgewichtszustand), sowie 200 RU für IL-22, 426 RU für IL-29, 3222 RU für IL-22BP und 3448 RU für IL-20R1 (Analyse der Kinetik-Ratenkonstanten).

### 3.6.3 Analyse der Bindungsaffinität

Die Analyse der Affinität zwischen IL-22 und IL-22BP erfolgte sowohl im Gleichgewichtszustand, sowie mit Bindungsexperimenten zur Ermittlung der Kinetik-Ratenkonstanten. Für alle Analysen wurde die Bindung des Analyten (IL-22BP, IL-22) an den auf der jeweiligen Referenzzelle immobilisierten Liganden (IL-29, IL-20R1) von der Bindung des Analyten an den auf der zweiten Flußzelle immobilisierten Liganden (IL-22, IL-22BP) subtrahiert. Die Regeneration der Sensorchip-Oberfläche erfolgte nach Bedarf durch Injektion von 10 mM Glycin-HCl (pH 2.0) für 12 Sn.

Für die Analyse der Affinität im Gleichgewichtszustand wurde rhIL-22 in verschiedenen Konzentrationen (20 / 15 / 10 / 7,5 / 5 / 4 / 3,25 / 2,5 / 1,75 / 1 / 0 nM) mit 3,75 nM rhIL-22BP<sub>2</sub>-Fc für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Bindung von freiem IL-22BP an eine mit rhIL-22-immobilisierte Sensorchipoberfläche und eine mit rhIL-29-immobilisierte Sensorchipoberfläche (Referenzzelle) für 5 min bei einer Flußrate von 10 µl/min gemessen. Die Kalkulation der Konzentration erfolgte basierend auf einer Standardkurve der Bindung verschiedener Konzentrationen von rhIL-22BP<sub>2</sub>-Fc (7,31 / 5,85 / 4,39 / 2,92 / 1,95 / 0,98 / 0,49 / 0,24 / 0 nM) in Doppelbestimmung. Die Affinität  $K_D$  (Dissoziationskonstante) ist als Reziprok der Assoziationskonstante definiert ( $1/K_A$ ) und beschreibt die Konzentration im Halbsättigungsbereich. Die Affinität im Gleichgewichtszustand wurde durch Auftragung der Konzentration des freien Analyten (IL-22BP) gegen die verwendete Konzentration des Bindungspartners (IL-22) mit Hilfe des Programms „Solution Affinity“ der BiaEvaluation 3.2 Software ausgegeben.

Für die Analyse der Kinetik-Ratenkonstanten wurde rhIL-22BP<sub>2</sub>-Fc in verschiedenen Konzentrationen (800 / 400 / 200 / 100 / 50 / 25 / 12,5 / 0 nM) über eine mit rhIL-22-immobilisierte Sensorchipoberfläche oder rhIL-22 in verschiedenen Konzentrationen (400 / 200 / 100 / 50 / 25 / 12,5 / 0 nM) über eine mit rhIL-22BP<sub>2</sub>-Fc-immobilisierte Sensorchipoberfläche bei einer Flußrate von 50 µL/min für 2 min geleitet. Die Ratenkonstanten der Assoziation (Assoziationsratenkonstante,  $K_{on}$ ) und Dissoziation (Dissoziationsratenkonstante,  $K_{off}$ ), sowie die als  $K_{on}/K_{off}$  definierte Affinität ( $K_D$ ) wurden durch Anpassen der gemessenen Resonanzen während der Assoziation und der Dissoziation an die Bindungsmodelle „Bivalenter Analyt“ (Bindung von IL-22BP an immobilisiertes IL-22) oder „Heterogener Ligand“ (Bindung von IL-22 an immobilisiertes IL-22BP) mittels BiaEvaluation 3.2 Software ausgegeben.

Für die Quantifizierung von IL-22BP wurde IL-22BP<sub>2</sub>-Fc in verschiedenen Konzentrationen (625 / 312 / 156 / 62,5 / 6,25 pM) für 10 min über eine mit rhIL-22-immobilisierte Sensorchipoberfläche mit oder ohne einem nachfolgenden Fluß von 20 µg/ml Anti-IL-22BP-Ak für 6 min bei einer Flußrate von 10 µl/min geleitet.

### **3.7 *In vivo* Untersuchungen**

#### **3.7.1 Tierexperimente**

Zur Untersuchung des Einflusses von IL-22 auf die kutane Expression von S100A9 und MMP1 und auf die hepatische, pulmonale und renale Expression von LBP wurde 14 Wochen alten männlichen Balb/c Mäusen i.p. 1 µg mL-22 oder ein entsprechendes Volumen PBS appliziert. Nach 1, 3, 6, 24, 48 oder 72 Stunden wurden die Tiere nach einer Narkotisierung mit einem Gemisch aus Rompun, Ketavet und NaCl (1:1:8) mittels Genickbruch getötet. Anschließend erfolgte die Entnahme der Haut für die Genexpressionsanalyse. Die Durchführung dieses Tierversuches erfolgte in der Bayer-Schering AG unter Leitung von Dr. med. Wolf-Dietrich Döcke.

Für die Induktion einer akuten Kolitis wurde 6-8 Wochen alten weiblichen Balb/c Mäusen über einen Zeitraum von 5 Tagen 2,5% Natriumdextransulfat (DSS) im Trinkwasser verabreicht. Kontrollmäuse erhielten im gleichen Zeitraum Trinkwasser ohne Zusätze. Nach 5 d wurden die Tiere nach einer Narkotisierung mit einem Gemisch aus Rompun, Ketavet und NaCl (1:1:8) mittels Genickbruch getötet. Die Durchführung der Experimente am DSS-Kolitis-Modell, sowie die anschließende Bestimmung des Körpergewichtes und der Kolonlänge, die Entnahme von Serum für die Analyse der systemischen Konzentration löslicher Mediatoren und die Entnahme von mesenterialen Lymphknoten und Kolon für die Genexpressionsanalyse erfolgte in der Medizinischen Klinik 1 (Gastroenterologie, Rheumatologie, Infektiologie) der Charité-Universitätsmedizin Berlin unter Leitung von PD Dr. med. Bianca Maria Wittig.

Die Tierexperimente wurden durch das Landesamt für Gesundheit und Soziales (LAGeSo) Berlin zugelassen und wurden im Einvernehmen mit den ethischen Richtlinien der Bayer-Schering AG (Experimente zur Untersuchung des Einflusses von IL-22 auf die kutane Expression von S100A9 und MMP1 und auf die hepatische, pulmonale und renale Expression von LBP) und der Charité-Universitätsmedizin Berlin (Experimente zur Induktion einer akuten Kolitis) durchgeführt. Die Haltung der Tiere erfolgte entsprechend den institutionellen Richtlinien der Tiereinrichtungen der Bayer Schering AG und der Charité-Universitätsmedizin Berlin.

#### **3.7.2 Probenentnahme bei Patienten und gesunden Kontrollprobanden**

Die Entnahme der Proben von Patienten erfolgte nach deren freiwilliger im Rahmen einer stationären Behandlung in der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie (Psoriasis-Patienten) und der Medizinischen Klinik 1 (Gastroenterologie, Rheumatologie,

Infektiologie) (Morbus Crohn-Patienten) der Charité-Universitätsmedizin Berlin. Die Entnahme von Proben gesunder Kontrollprobanden erfolgte nach freiwilliger Einwilligung durch Mitarbeiter der Charité-Universitätsmedizin Berlin in der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie. Von allen Probanden wurde nach Aufklärung durch den durchführenden Arzt die unterschriebene Patienteninformation und Einwilligungserklärung genommen. Die Probenentnahme erfolgte mit Zustimmung des zuständigen Ethikkomitees.

Die Entnahme von Hautbiopsien erfolgte durch das Psoriasis-Studienzentrum (Leiterin: Dr. med. S. Philipp) in der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin. Nach lokaler Anästhesie durch intradermale Injektion von 1 ml Xylonest® 1% und anschließender Desinfektion des ausgewählten Hautareals mit Braunol® erfolgte die Entnahme einer 5 mm Stanzbiopsie. Die Proben wurden sofort nach Entnahme in flüssigen Stickstoff überführt und anschließend bei -80°C gelagert. Die Entnahme von Blut erfolgte durch das Psoriasis Studienzentrum in der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie (Psoriasis-Patienten, gesunde Kontrollprobanden) und der Medizinischen Klinik 1 der Charité-Universitätsmedizin Berlin (Gastroenterologie, Rheumatologie, Infektiologie) unter der Leitung von PD Dr. B. Wittig (Morbus Crohn-Patienten und gesunde Kontrollprobanden).

### 3.8 Statistische Analyse

Das Signifikanzniveau der IL-22-induzierten Veränderung der Genexpression von S100A7, CALML5 und MMP1 in primären Keratinozyten, sowie der IL-22-induzierten Veränderung der LBP-Produktion in primären Hepatozyten und HepG2-Zellen wurde nach Prüfung durch den (einseitigen) Wilcoxon-Vorzeichen-Rangsummentest für verbundene Stichproben ermittelt. Dieser nicht-parametrische Test untersucht die einseitige Varianz der Mediane zweier verbundener Stichproben unbekannter Verteilung bezüglich eines Merkmals. Dazu erfolgt nach Bildung der Differenzen der Prüfgröße beider Gruppen, die Ermittlung der Rangsummen aller negativer und aller positiver Differenzen, sowie der Differenz der positiven und der negativen Rangsumme und damit der Prüfvariable W. Diese wird in Prozent angegeben, wobei 100 % einem Signifikanzniveau von  $p = 1$  entspricht. Eine statistische Signifikanz von  $p \leq 0,05$  wird mit „\*“, von  $p \leq 0,01$  mit „\*\*“ und von  $p \leq 0,001$  mit „\*\*\*“ bewertet.

Das Signifikanzniveau aller Ergebnisse, hinsichtlich der Genexpression in der Haut und des „psoriasis area and severity index“ (PASI)-Wertes von Psoriasis Patienten und gesunden Kontrollprobanden, der Konzentration von huIL-22, huIFN- $\gamma$ , huIL-1 $\beta$ , huTNF- $\alpha$  und huIL-17A im Plasma von Patienten mit Psoriasis und Morbus Crohn und gesunden

Kontrollprobanden, sowie des Körpergewichtes, der Kolonlänge und der Genexpression in Kolon und Lymphknoten von DSS-behandelten oder Wasser-behandelten Mäusen und der Genexpression in Leber, Lunge und Niere von IL-22-behandelten und PBS-behandelten Mäusen wurde nach Prüfung durch den Mann-Whitney-U-Test ermittelt. Mit diesem nicht-parametrischen Test kann untersucht werden, ob zwei unabhängige Grundgesamtheiten einer Grundgesamtheit angehören. Dafür wird die Nullhypothese  $H_0$ , welche besagt, daß beide Grundgesamtheiten gleich sind, geprüft. Dazu werden die Werte beider Stichproben in Reihen aufsteigender Folge eingefügt, wobei jeder Wert der einen Stichprobe mit dem Wert der anderen Stichprobe verglichen wird und Rangsummen gebildet werden. Diese führen zur Ermittlung der Prüfvariable U und des kritischen z-Wertes, welcher das Signifikanzniveau bestimmt. Eine statistische Signifikanz von  $p \leq 0,05$  wird mit „\*“, von  $p \leq 0,01$  mit „\*\*“ und von  $p \leq 0,001$  mit „\*\*\*“ bewertet.

Die Analyse der Korrelation zwischen der IL-22-Plasma-Konzentration und der Höhe des PASI erfolgte mittels der bivariaten Spearmans Rang-Korrelation. Der ermittelte Wert des Korrelationskoeffizienten  $r_s$  bestimmt hierbei die statistische Signifikanz, welche für  $p \leq 0,05$  wird mit „\*“, für  $p \leq 0,01$  mit „\*\*“ und für  $p \leq 0,001$  mit „\*\*\*“ bewertet wird.

Der L-Test nach Page ist ein Trendtest zur Überprüfung, ob Behandlungsarten oder -intensitäten einen zunehmend starken Einfluss auf die untersuchte Variable ausüben (Trend-Alternativhypothese). Nach Erstellung einer Rangfolge der Behandlungsgruppen (n) je Wiederholungsgruppe (m) und der Bildung der Rangsummen der Behandlungsgruppen aller Wiederholungsgruppen erfolgt eine Multiplikation der Rangsummen mit der vorhergesagten Rangfolge (k) und die Addition dieser Produkte (L). Die statistische Signifikanz wird bei  $n=5$  und  $m=2$  für  $L \geq 103$  mit  $p \leq 0,05$  („\*“), für  $L \geq 106$  mit  $p \leq 0,01$  („\*\*“) und für  $L \geq 109$   $p \leq 0,001$  („\*\*\*“) bewertet. Das Signifikanzniveau wird bei  $n=6$  und  $m=3$  für  $L \geq 244$  mit  $p \leq 0,05$  („\*“), für  $L \geq 252$  mit  $p \leq 0,01$  („\*\*“) und für  $L \geq 260$   $p \leq 0,001$  („\*\*\*“) bewertet. Die statistische Auswertung erfolgte für alle verwendeten Tests mittels SPSS Version 12.0 Software.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Produktion von IL-22

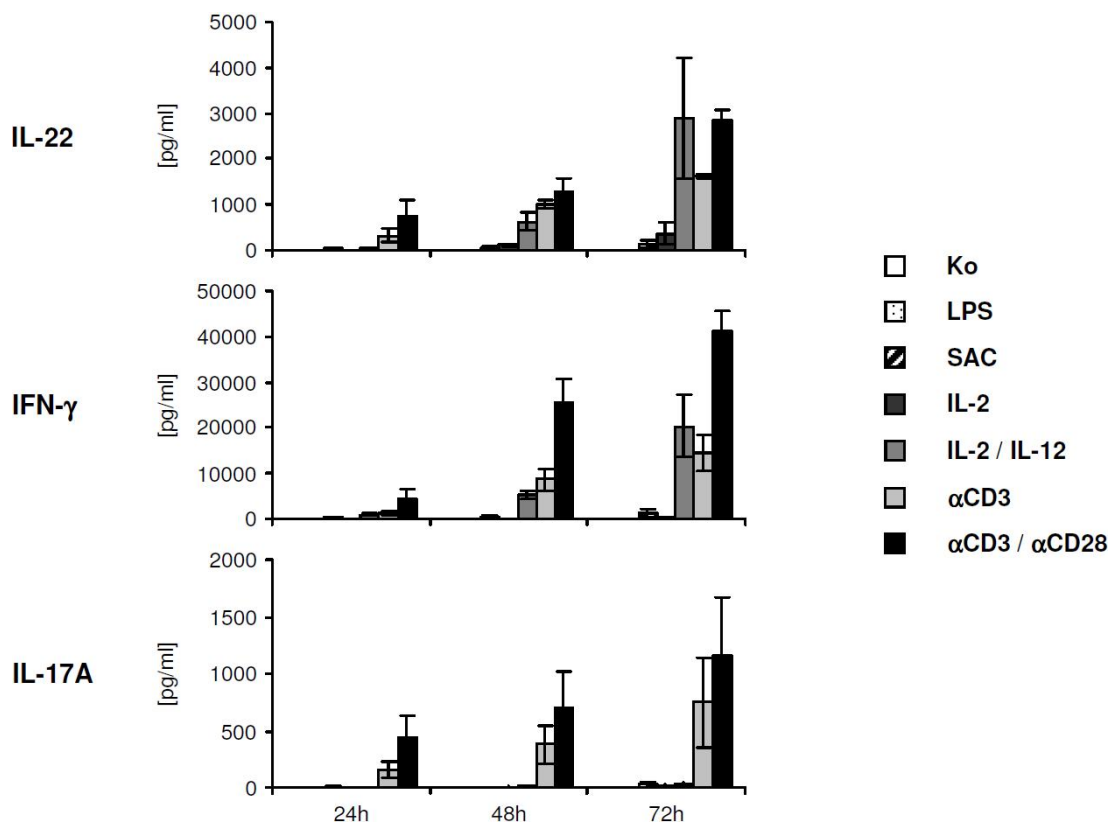
#### 4.1.1 Produktion von IL-22 *in vitro*

##### 4.1.1.1 Produktion von IL-22 durch Immunzellen

Zu Beginn dieser Arbeit waren die zellulären Quellen von IL-22 bislang nur auf der Ebene der mRNA-Expression untersucht [58]. Wie in Kapitel 1.3.2 erwähnt, wird IL-22-mRNA von aktivierten T-Zellen, insbesondere Th1- und Th17-Zellen und aktivierten NK-Zellen, nicht jedoch von anderen Immunzellpopulationen oder Gewebszellen, wie Keratinozyten exprimiert [55, 109].

Um diese Ergebnisse auf Ebene des sezernierten Proteins zu validieren, wurde zunächst die Proteinexpression von IL-22 durch Immunzellen *in vitro* untersucht. Dazu wurden aus dem Blut gesunder Spender PBMC isoliert, und diese in einer Gesamtkultur für 24, 48 und 72 h in An- und Abwesenheit zelltypspezifischer Stimuli kultiviert. Es wurde LPS, ein Zellwandbestandteil Gram-negativer Bakterien, zur Stimulation von Monozyten, welche den entsprechenden Rezeptorkomplex bestehend aus den Oberflächenmolekülen CD14, TLR4 und dem akzessorischen Molekül MD2 tragen, verwendet. B-Zellen wurden mit hitzeinaktivierten fixierten SAC stimuliert, deren in hoher Dichte auf der Zelloberfläche vorhandene Protein-A-Moleküle durch Quervernetzung von zelloberflächenständigen IgG-Molekülen eine mitogene Stimulation von B-Zellen induzieren [153]. Durch eine Kultur in Anwesenheit von IL-2 und IL-12 wurde eine Stimulation insbesondere von NK-Zellen, welche gegenüber naiven undifferenzierten T-Zellen konstitutiv einen funktionellen IL-2-Rezeptor und IL-12-Rezeptors tragen, erreicht [154, 155]. T-Zellen wurden durch Anti-CD3-mAk stimuliert, welche durch Bindung an die  $\epsilon$ -Untereinheit des CD3-Moleküls eine T-Zell-Rezeptorstimulation bewirken. Eine zusätzliche Kostimulation von T-Zellen erfolgte durch Aktivierung des zelloberflächenständigen kostimulatorischen Moleküls CD28 mittels Anti-CD28-mAk. Die Aktivierung der einzelnen PBMC-Subpopulationen durch die verwendeten Stimuli wurde durch Analyse der Oberflächenexpression des Zellaktivierungsmarkers CD69 mittels Durchflußzytometrie sichergestellt. In den Zellkulturüberständen dieser Kulturen wurde anschließend die Konzentration von IL-22 und als Vergleich die Konzentration der prototypischen Th1- und Th17-Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-17A mittels ELISA bestimmt. Die in Abb. 1 dargestellten Ergebnisse zeigen, daß IL-22 nur durch eine Stimulierung der PBMC mit IL-2/IL-12 und Anti-CD3-mAk produziert wurde, wobei die Konzentration von IL-22 im Zellkulturüberstand der IL-2/IL-12- und Anti-CD3-mAk-stimulierten PBMC bis 72 h Stimulationszeit kontinuierlich anstieg. Die zusätzliche

Anwesenheit von Anti-CD28-mAk führte zu einer Steigerung der durch Anti-CD3-mAk-Stimulation induzierten IL-22-Produktion und die Zugabe von IL-12 bewirkte eine massive Steigerung der IL-2-induzierten IL-22-Produktion. Eine Stimulation der PBMC mit LPS und SAC bewirkte keine klare Produktion von IL-22. Aktivierte Monozyten und B-Zellen stellen demnach im Einklang mit der fehlenden mRNA-Expression von IL-22 in diesen Zellen, keine direkten zellulären Quellen von IL-22 dar und bewirken auch keine Zytokin-vermittelte, indirekte Produktion von IL-22 durch andere Zellpopulationen.



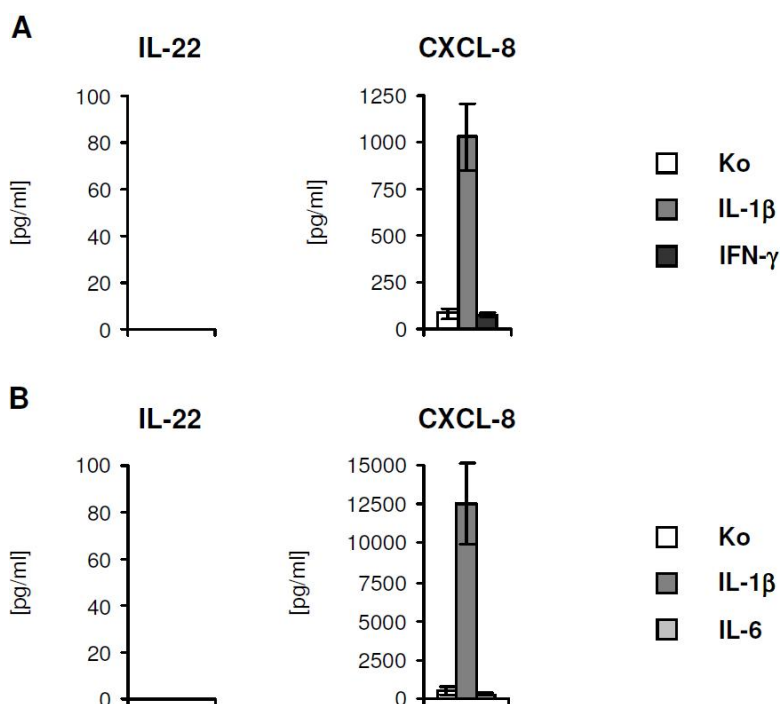
**Abb. 1: Produktion von IL-22, IFN- $\gamma$  und IL-17A durch Immunzellen.** PBMC, frisch isoliert aus dem Blut gesunder Spender, wurden für 24, 48 und 72 h in An- und Abwesenheit (Kontrolle) zelltypspezifischer Stimuli (Monozyten: LPS, B-Zellen: SAC, NK-Zellen: rhIL-2, rhIL-2/rhIL-12, T-Zellen: Anti-CD3-mAk, Anti-CD3-mAk/Anti-CD28-mAk) stimuliert. Die Bestimmung der Konzentration von IL-22, IFN- $\gamma$  und IL-17A in den gewonnenen Zellkulturüberständen erfolgte mittels ELISA. Dargestellt sind die Ergebnisse von jeweils drei unabhängigen Versuchen als Mittelwerte ( $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes).

Die Proteinexpression von IFN- $\gamma$  war ähnlich der Produktion von IL-22 durch die verwendeten Stimuli reguliert (Abb. 1). Eine Stimulation mit IL-2/IL-12 und Anti-CD3-mAk führte zu einer massiven und im zeitlichen Verlauf kontinuierlich ansteigenden Produktion von IFN- $\gamma$ . Diese war jedoch im Vergleich zur Produktion von IL-22 etwa um das Zehnfache stärker induziert, sowie stärker abhängig von einer CD28-vermittelten

Kostimulation. IL-17A wurde im Gegensatz zu IL-22 und IFN- $\gamma$  nur durch eine Stimulation der PBMC mittels Anti-CD3-mAk und verstärkt durch eine zusätzliche Kostimulation durch Anti-CD28-mAk produziert (Abb. 1). Die IL-17A-Konzentration im Zellkulturüberstand der Anti-CD3-mAk- und Anti-CD3-mAk/Anti-CD28-mAk-behandelten PBMC war jedoch zu allen untersuchten Zeitpunkten 2-fach geringer als die von IL-22. Diese Ergebnisse zeigen, daß eine Aktivierung von PBMC mit NK-Zell- und T-Zell-spezifischen Stimuli zu einer starken, von einer Kostimulation *via* CD28 begünstigten Induktion der IL-22-Proteinexpression führte (Abb. 1) und bestätigen somit die Ergebnisse der IL-22-mRNA-Expressionsanalyse [58]. Dies zeigt, daß unter den Immunzellen IL-22 ähnlich wie IFN- $\gamma$  von aktivierten T-Zellen und aktivierten NK-Zellen produziert wird, während IL-17A in diesem System ausschließlich von aktivierten T-Zellen produziert wird.

#### 4.1.1.2 Produktion von IL-22 durch Gewebezellen

Als nächstes wurde die Produktion von IL-22 durch nichthämatopoetische Gewebszellen untersucht. Dazu wurden primäre humane Keratinozyten und primäre humane Hepatozyten als gewebetypische Einzelzellpopulationen der Haut und der Leber für diese Analyse gewählt. Diese wurden mit IL-1 $\beta$  und IFN- $\gamma$  (Keratinozyten) oder mit IL-1 $\beta$  und IL-6 (Hepatozyten) stimuliert. In den gewonnenen Zellkulturüberständen wurde anschließend die Konzentration von IL-22 mittels ELISA bestimmt.





**Abb. 2: Produktion von IL-22 durch Gewebezellen.** A, Primäre humane Keratinozyten wurden für 72 h (IL-22) oder 24 h (CXCL8) mit und ohne (Kontrolle) rhIL-1 $\beta$  und rhIFN- $\gamma$  kultiviert. B, Primäre humane Hepatozyten wurden für 48 h mit und ohne (Kontrolle) rhIL-1 $\beta$  und rhIL-6 kultiviert. Die Bestimmung der Konzentration von IL-22 und CXCL8 in den gewonnenen Zellkulturüberständen erfolgte mittels ELISA bzw. Immulite<sup>®</sup>-System. Dargestellt sind die Ergebnisse von jeweils drei (A), (B: CXCL8) unabhängigen Versuchen als Mittelwerte ( $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes) oder eines Versuches (B: IL-22).

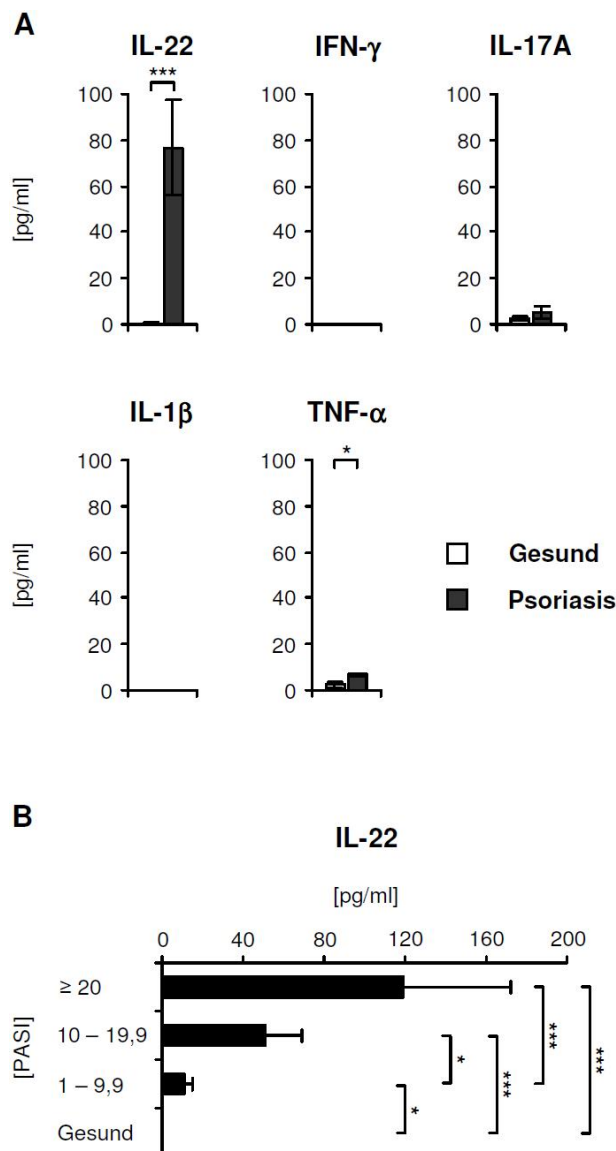
Sowohl Keratinozyten als auch Hepatozyten wiesen keine konstitutive Proteinexpression von IL-22 auf (Abb. 2A, B). Keine der Stimulationen führte hier zu nachweisbaren Mengen von IL-22 in den Zellkulturüberständen (Abb. 2A, B). Eine klare Aktivierung der Zellen durch die verwendeten Stimuli war jedoch durch die stark erhöhte Konzentration von CXCL8 in den Zellkulturüberständen deutlich nachweisbar (Abb. 2A, B). Die hier gezeigte fehlende Produktion von IL-22 durch Keratinozyten steht im Einklang mit früheren Untersuchungen durch unsere Arbeitsgruppe, welche keine IL-22-mRNA-Expression in diesen Zellen nachweisen konnte [109]. Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß Gewebezellen wahrscheinlich keine zellulären Quellen von IL-22 darstellen.

#### 4.1.2 Produktion von IL-22 bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen

Aktivierte T-Zellen und aktivierte NK-Zellen stellen wichtige Produzenten von IL-22 dar (Abb. 1). Im weiteren sollte untersucht werden, ob chronisch-entzündliche Erkrankungen, welche mit einer peripheren Infiltration und chronischen Aktivierung dieser Zellen und deren IL-22-mRNA-Expression assoziiert sind, auch durch erhöhte systemische Spiegel von IL-22 gekennzeichnet sind. Eine solche Erkrankung ist die Hautkrankheit *Psoriasis vulgaris* (Schuppenflechte), welche phänotypisch durch scharf abgegrenzte, leicht erhabene erythematöse Läsionen (Plaques) mit einer starken Schuppenbildung gekennzeichnet ist [156].

Aus dem Blut von Patienten mit Psoriasis und von gesunden Kontrollprobanden wurde Plasma gewonnen und mittels ELISA die Konzentration von IL-22, wiederum im Vergleich zur Konzentration von IFN- $\gamma$  und IL-17A, sowie der inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  bestimmt. Wie die in Abb. 3 dargestellten Ergebnisse zeigen, war die Plasma-Konzentration von IL-22 bei Patienten mit Psoriasis gegenüber gesunden Kontrollprobanden stark erhöht (Abb. 3A). Im Gegensatz dazu waren die Plasma-Spiegel von IL-17A in beiden Gruppen unverändert und die Spiegel von TNF- $\alpha$  zwar signifikant, jedoch nur minimal im Blut von Psoriasis-Patienten gegenüber den gesunden Kontrollprobanden erhöht. IFN- $\gamma$  und IL-1 $\beta$  waren im Plasma beider Gruppen nicht nachweisbar. Als nächstes wurde eine mögliche Abhängigkeit der IL-22-Spiegel im Blut von Psoriasis-Patienten vom Schweregrad der Erkrankung untersucht. Dieser wird mit dem sogenannten PASI („Psoriasis Area and Severity Index“) beschrieben, welcher sowohl das Ausmaß der befallenen Hautoberfläche als auch den Grad der Rötung und

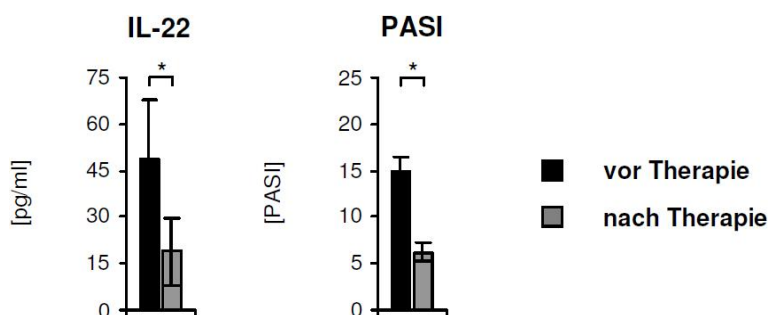
Schuppung berücksichtigt. Tatsächlich war die Plasmakonzentration von IL-22 signifikant mit steigendem Schweregrad erhöht (Abb. 3B). Die durchschnittlichen IL-22-Plasmakonzentrationen betrugen 10,52 pg/ml für PASI 1-9,9, 51,22 pg/ml für PASI 10-19,9 und 118,75 pg/ml für PASI >20.



**Abb. 3: Systemische Spiegel von IL-22 bei Psoriasis und Abhängigkeit vom Schweregrad der Erkrankung.** A, Die Konzentration von IL-22, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  im Blutplasma von Psoriasis-Patienten und gesunden Kontrollprobanden wurde mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse von sieben Spendern pro Gruppe als Mittelwerte ( $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes). Das Signifikanzniveau der Unterschiede zwischen beiden Gruppen wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt (\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ ). B, Die Konzentration von IL-22 im Blutplasma von Psoriasis-Patienten und gesunden Kontrollprobanden wurde mittels ELISA bestimmt. Die Ermittlung des Schweregrades der Erkrankung erfolgte anhand des PASI. Dargestellt sind die Ergebnisse von fünfzehn (gesund), sechzehn (PASI 1 – 9,9), elf (PASI 10 – 19,9) und fünf (PASI  $\geq 20$ ) Spendern als Mittelwerte ( $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes). Das Signifikanzniveau der Unterschiede zwischen den Gruppen wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt (\* $p < 0,05$ , \*\*\* $p \leq 0,001$ ).

Eine Korrelationsanalyse mit einer Gesamtzahl von 47 Psoriasis-Patienten ergab eine starke positive Korrelation der IL-22-Plasma-Konzentration mit der Höhe des PASI (Spearman's Korrelationskoeffizient = 0,73;  $p < 0,001$ ).

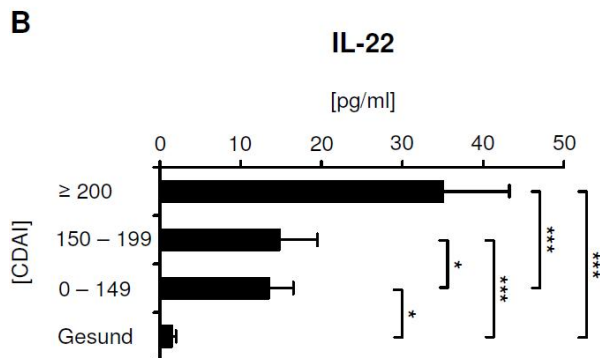
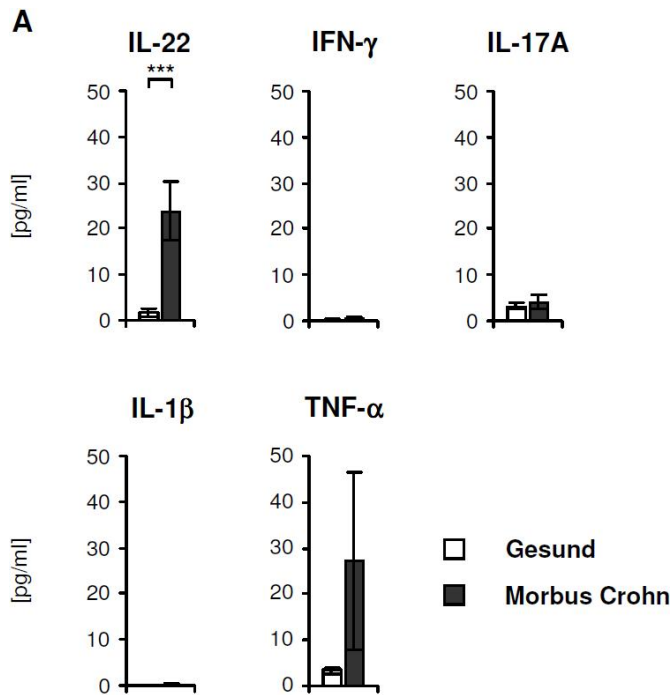
Im Weiteren sollte untersucht werden, ob eine Psoriasis-Therapie, die zu einer deutlichen Verbesserung des Hautbefundes führt, die Blutplasmakonzentration von IL-22 beeinflusst. Dazu wurde von 7 Psoriasis-Patienten vor und nach einer erfolgreichen durch UV-Bestrahlung-dominierten Therapie Blut für die Gewinnung von Plasma entnommen und deren Konzentration von IL-22 mittels ELISA bestimmt. Die Therapie bewirkte neben der Verminderung des PASI eine starke Verminderung der IL-22-Plasma-Spiegel (Abb. 4). Dieses Ergebnis untermauert die positive Korrelation der IL-22-Plasma-Spiegel mit dem Schweregrad der Erkrankung und lässt eine wichtige Rolle von IL-22 bei dieser Erkrankung vermuten. Weiterhin unterstützen diese Ergebnisse erstmalig eine mögliche Nutzbarkeit von IL-22 als Biomarker für die unabhängige Bewertung des Krankheitszustandes und des Therapieerfolges bei Psoriasis.



**Abb. 4: Einfluß einer anti-psoriatischen Therapie auf die systemischen IL-22-Spiegel.** Die Konzentration von IL-22 im Blutplasma von Psoriasis-Patienten vor und nach einer anti-psoriatischen Therapie wurde mittels ELISA bestimmt. Die Ermittlung des Schweregrades der Erkrankung vor und nach anti-psoriatischer Therapie erfolgte anhand des PASI. Daten von sieben Spendern pro Gruppe sind dargestellt als Mittelwerte ( $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes). Das Signifikanzniveau der Unterschiede zwischen beiden Gruppen wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt (\* $p < 0,05$ ).

Neben der Psoriasis wurde Morbus Crohn als zweite chronisch-entzündliche und durch lokale Anwesenheit von IL-22-produzierenden T-Zellen gekennzeichnete Erkrankung hinsichtlich systemischer IL-22-Spiegel untersucht. Zusammen mit *Colitis ulcerosa* zählt Morbus Crohn zur Gruppe der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und ist durch eine chronische Entzündung der Darmschleimhaut (intestinale Mukosa) gekennzeichnet. Um zu untersuchen, ob Morbus-Crohn-Patienten ebenfalls erhöhte systemische IL-22-Spiegel haben, wurde aus dem Blut von Morbus-Crohn-Patienten und von gesunden Kontrollprobanden Plasma gewonnen und mittels ELISA die Konzentration von IL-22 im

Vergleich zur Konzentration von IFN- $\gamma$  und IL-17A, sowie der inflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  bestimmt.



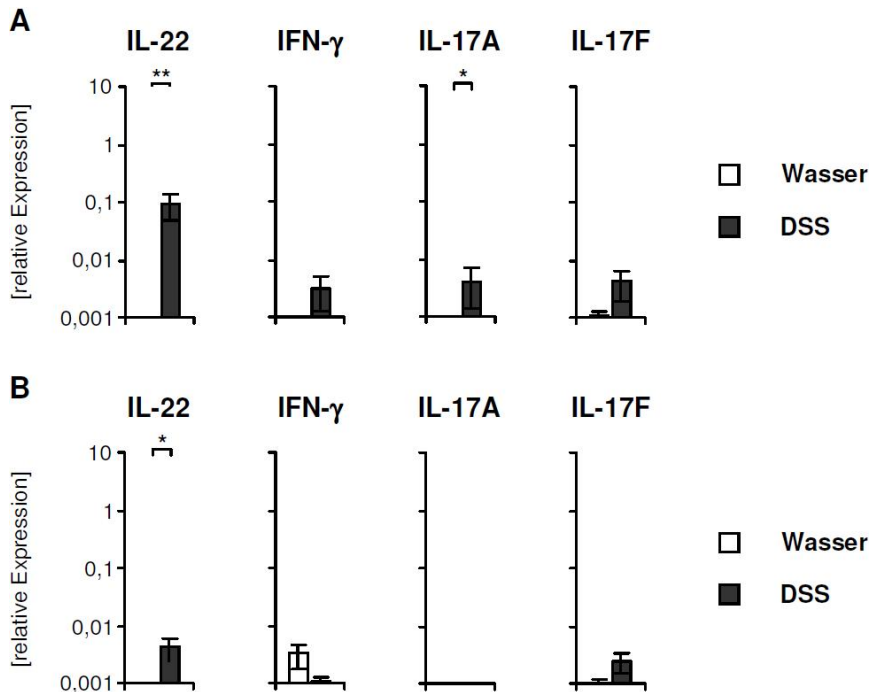
**Abb. 5: Systemische Spiegel von IL-22 bei Morbus Crohn und Abhängigkeit vom Schweregrad der Erkrankung.** A, Die Konzentration von IL-22, IFN- $\gamma$ , IL-17A, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  im Blutplasma von Morbus Crohn-Patienten und gesunden Kontrollprobanden wurde mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse von zehn Spendern pro Gruppe als Mittelwerte ( $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes). Das Signifikanzniveau der Unterschiede zwischen beiden Gruppen wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt (\*\*p < 0,001). B, Die Konzentration von IL-22 im Blutplasma von Morbus Crohn-Patienten und gesunden Kontrollprobanden wurde mittels ELISA bestimmt. Die Ermittlung des Schweregrades der Erkrankung erfolgte anhand des CDAl. Dargestellt sind die Ergebnisse von fünfzehn (gesund), vierzehn (CDAl 0-149), sieben (CDAl ≥150-199) und zehn (CDAl ≥200) Spendern als Mittelwerte ( $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes). Das Signifikanzniveau der Unterschiede zwischen den Gruppen wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt (\*p < 0,05, \*\*\*p ≤ 0,001).

Gegenüber den gesunden Kontrollprobanden war die Plasma-Konzentration von IL-22 bei Morbus-Crohn-Patienten signifikant ( $p < 0,01$ ) erhöht, jedoch etwa 3-fach geringer als bei Psoriasis-Patienten (Abb. 5A, 3A). Im Gegensatz dazu waren hinsichtlich der Plasma-Spiegel von IFN- $\gamma$ , IL-17A und IL-1 $\beta$  keine Unterschiede zwischen beiden Gruppen nachweisbar, wobei die Konzentrationen dieser Zytokine an der unteren Nachweisgrenze des jeweiligen Testsystems lagen (Abb. 5A). Die Plasma-Konzentration von TNF- $\alpha$  war bei einem von zehn in die Analyse einbezogenen Morbus-Crohn-Patienten stark erhöht, jedoch im Mittel der Gruppe nicht signifikant erhöht (Abb. 5A).

Als nächstes wurde eine mögliche Abhängigkeit der IL-22-Spiegel im Blut von Morbus-Crohn-Patienten von dem Schweregrad der Erkrankung untersucht. Dieser wird mit dem sogenannten CDAI („Crohn’s Disease Activity Index“) beschrieben, einem Maß für die in Schüben verlaufende Krankheitsaktivität, wobei ein Wert  $>150$  einen akuten Schub anzeigt. In die Berechnung des CDAI fließt die Anzahl von Durchfällen/weichen Stühle pro Woche, der Grad der Bauchschmerzen, das Vorhandensein abdominaler Resistenz, der Hämatokrit, der Grad des Allgemeinbefindens sowie das Auftreten möglicher Komplikationen wie Arthritis, Fisteln, Fieber und Abszessen mit ein. Die Ergebnisse zeigen, daß die IL-22-Plasmakonzentration mit steigendem Schweregrad signifikant erhöht war, wobei die mittleren IL-22-Plasmakonzentrationen 13,49 pg/ml bei CDAI 0-149, 14,83 pg/ml bei CDAI 150-199 und 35,05 pg/ml bei CDAI  $>199$  betrugen (Abb. 5B). Die signifikante Abhängigkeit der IL-22-Plasma-Konzentration vom Schweregrad der Erkrankung identifiziert IL-22 erstmals als einen wichtigen unabhängigen Biomarker für die Kontrolle des Aktivitätszustandes bei Morbus Crohn.

Die hohen systemischen IL-22-Spiegel bei den untersuchten chronisch-entzündlichen Erkrankungen lassen eine Produktion von IL-22 durch aktivierte T-Zellen und / oder aktivierte NK-Zellen am Entzündungsort vermuten. Als nächstes sollte untersucht werden, ob neben der Produktion im entzündeten Gewebe IL-22 auch in drainierenden Lymphknoten produziert wird. Aufgrund der Morbus Crohn-ähnlichen histologischen intestinalen Veränderungen sowie Ähnlichkeiten im Genexpressionsmuster stellt die DSS-induzierte experimentelle Kolitis ein gut etabliertes Modell zur Untersuchung grundlegender pathologischer Mechanismen des Morbus Crohn dar [157]. Die Gabe von 2,5% DSS im Trinkwasser für fünf aufeinanderfolgende Tage führte in den behandelten Mäusen zu einem signifikanten durchschnittlichen Gewichtsverlust von 11,7 % ( $p < 0,01$ ) und zu einer signifikanten Verminderung der Kolonlänge um durchschnittlich 36 % ( $p < 0,01$ ) gegenüber einer Gabe von DSS-freiem Trinkwasser (Daten nicht gezeigt). Diese Befunde in der DSS-behandelten Gruppe stellen deutliche Anzeichen einer massiven Darmentzündung dar. Die mRNA-Expression von IL-22 und als Vergleich auch von

IL-17A, IL-17F und IFN- $\gamma$  im Kolon und in den drainierenden Lymphknoten der DSS-behandelten und der Wasser-behandelten Tiere wurde mittels qPCR untersucht.



**Abb. 6: Expression von IL-22 in experimenteller Kolitis.** Durch Zusatz von DSS im Trinkwasser über einen Zeitraum von 5 d wurde in BALB/c Mäusen eine akute Kolitis induziert. Kontroll-Mäuse erhielten Trinkwasser ohne DSS. A, B, Die Analyse der mRNA-Expression von IL-22, IFN- $\gamma$ , IL-17A und IL-17F in Kolon (A und mesenterialen Lymphknoten (B erfolgte durch qPCR. Dargestellt ist die Genexpression relativ zu der des Haushaltsgens HPRT als Mittelwert ( $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes) von sechs Tieren pro Gruppe. Das Signifikanzniveau der Unterschiede zwischen beiden Gruppen wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ ).

Wie die in Abb. 6A dargestellten Ergebnisse zeigen, war IL-22 im Kolon der DSS-behandelten Mäuse sehr stark exprimiert ( $p < 0,01$ ), während keine IL-22-Expression im Kolon der Wasser-behandelten Mäuse nachweisbar war. Auch in den mesenterialen Lymphknoten der DSS-behandelten Mäuse war IL-22 im Gegensatz zu den Wasser-behandelten Tieren ebenfalls erhöht ( $p < 0,05$ ), wobei die Expression hier etwa 20-mal geringer war als im Kolon dieser Tiere (Abb. 6B). IFN- $\gamma$ , IL-17A und IL-17F wiesen teilweise ebenfalls eine erhöhte Expression im Kolon der DSS-behandelten Mäuse auf, wobei eine signifikante Steigerung gegenüber den Wasser-behandelten Tieren nur für IL-17A nachgewiesen werden konnte (Abb. 6A).

Im Gegensatz zu IL-22 war in den mesenterialen Lymphknoten keine IL-17A- bzw. keine klare Expressionserhöhung von IFN- $\gamma$  und IL-17F in der DSS-behandelten Gruppe gegenüber der Wasser-behandelten Gruppe nachweisbar (Abb. 6B). Diese Ergebnisse

lassen vermuten, daß die bei Morbus Crohn erhöhten systemischen IL-22-Spiegel vor allem auf einer verstärkten Induktion von IL-22 im Darm und in geringerem Ausmaß auch in den drainierenden Lymphknoten beruhen.

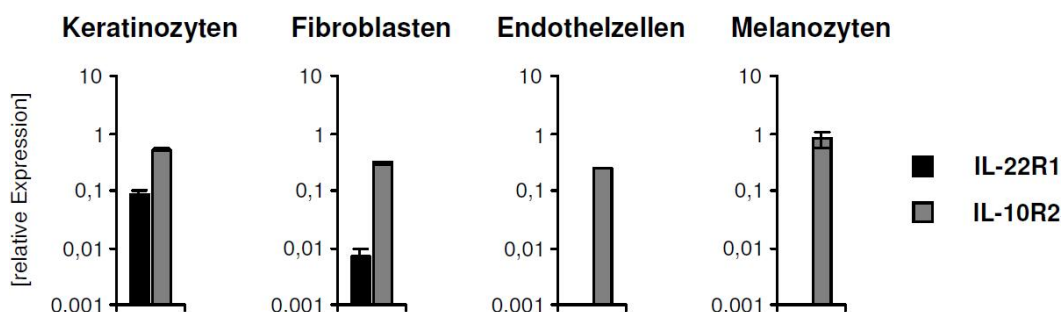
## 4.2 Zielzellen von IL-22

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten die Zielzellen von IL-22 identifiziert und näher charakterisiert werden. Hierbei sollte insbesondere auf Zellen der humanen Haut und der humanen Leber fokussiert werden. Dazu wurde die Expression der IL-22-Rezeptorkomponenten IL-22R1 und IL-10R2 und die zelluläre Sensitivität gegenüber IL-22 durch Analyse der Signaltransduktion bzw. der Expression von SOCS-Proteinen in einzelnen Zellpopulationen der Haut und in Hepatozyten untersucht.

### 4.2.1 Zielzellen von IL-22 in der Haut

#### 4.2.1.1 IL-22-Rezeptorexpression in Gewebezellen der Haut

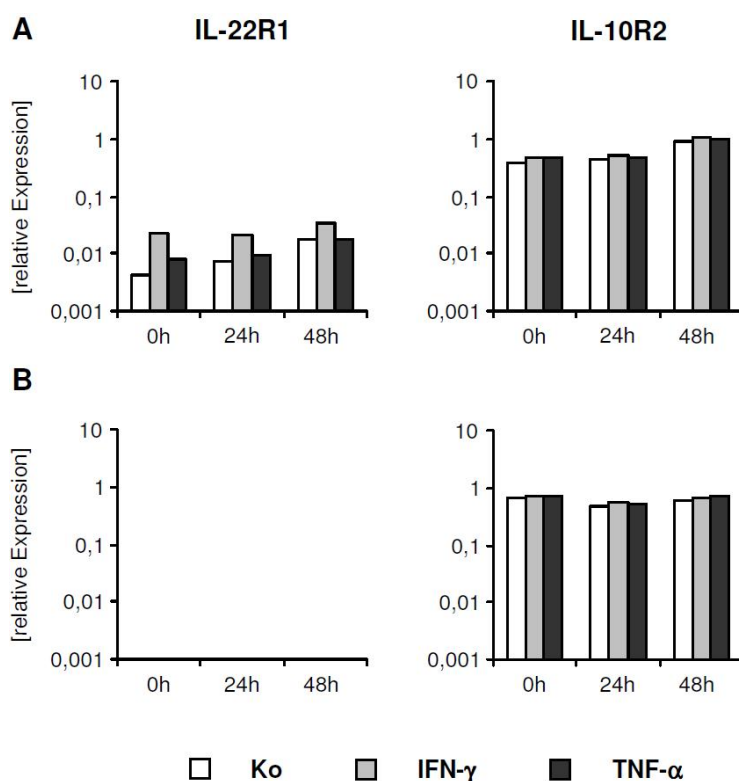
Kürzlich wurden durch unsere Arbeitsgruppe Keratinozyten aufgrund ihrer hohen IL-22-Rezeptorexpression als eine der wichtigsten Zielzellen von IL-22 identifiziert [109]. Keratinozyten stellen die zahlenreichste Zellpopulation in der Haut dar. Neben den epidermalen Keratinozyten sind dermale Fibroblasten, dermale Endothelzellen und Melanozyten weitere wichtige Zelltypen in der Haut. Um zu klären, ob diese Zellen ebenfalls Zielzellen von IL-22 darstellen, wurde zunächst die mRNA-Expression beider Rezeptorketten des IL-22-Rezeptors in diesen Zellen mittels qPCR untersucht.



**Abb. 7: Expression von IL-22R1 und IL-10R2 in Keratinozyten, Fibroblasten, Endothelzellen und Melanozyten.** Primäre humane Keratinozyten, primäre humane dermale Fibroblasten, primäre humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen und primäre humane Melanozyten wurden lysiert und deren RNA gewonnen. Die Genexpressionsanalyse erfolgte durch qPCR. Dargestellt ist die Genexpression relativ zu der des Haushaltgens HPRT als Mittelwert ( $\pm$  Spannweite des Mittelwertes) von zwei unabhängigen Versuchen.

Alle untersuchten Zelltypen zeigten eine starke Expression der IL-10R2-Rezeptorkette (Abb. 7). Diese war vergleichbar mit der Expression in primären Keratinozyten. Fibroblasten wiesen außerdem eine klare, obgleich im Vergleich zu Keratinozyten 12-mal geringere Expression von IL-22R1 auf, jedoch fehlte die Expression dieser Rezeptorkette in den Endothelzellen und Melanozyten (Abb. 7). Diese Ergebnisse ließen vermuten, daß Fibroblasten, jedoch nicht Endothelzellen oder Melanozyten, weitere Zielzellen von IL-22 in der Haut darstellen könnten.

Für primäre humane Keratinozyten konnte bereits gezeigt werden, daß die Expression der IL-22R1-Rezeptorkette durch IFN- $\gamma$  dosisabhängig und zeitabhängig steigerbar ist [109]. Daher sollte als nächstes untersucht werden, ob eine Vorbehandlung mit IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$  für 24h in Fibroblasten ebenfalls zu einer Steigerung der konstitutiv eher schwachen Expression von IL-22R1 führt oder sogar eine Induktion dieser Expression in Zellen mit einer *a priori* fehlenden IL-22R1-Expression (Endothelzellen) bewirkt.



**Abb. 8: Einfluß von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  auf die Expression von IL-22R1 und IL-10R2 in Fibroblasten und Endothelzellen.** Primäre humane dermale Fibroblasten (A) und primäre humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen (B) wurden mit und ohne (Kontrolle) rhIFN- $\gamma$  und rhTNF- $\alpha$  für 24h stimuliert, anschließend gewaschen und sofort lysiert (0h) oder für weitere 24 oder 48 h kultiviert. Die Genexpressionsanalyse erfolgte durch qPCR. Dargestellt ist die Genexpression relativ zu der des Haushaltgens HPRT eines Versuches.



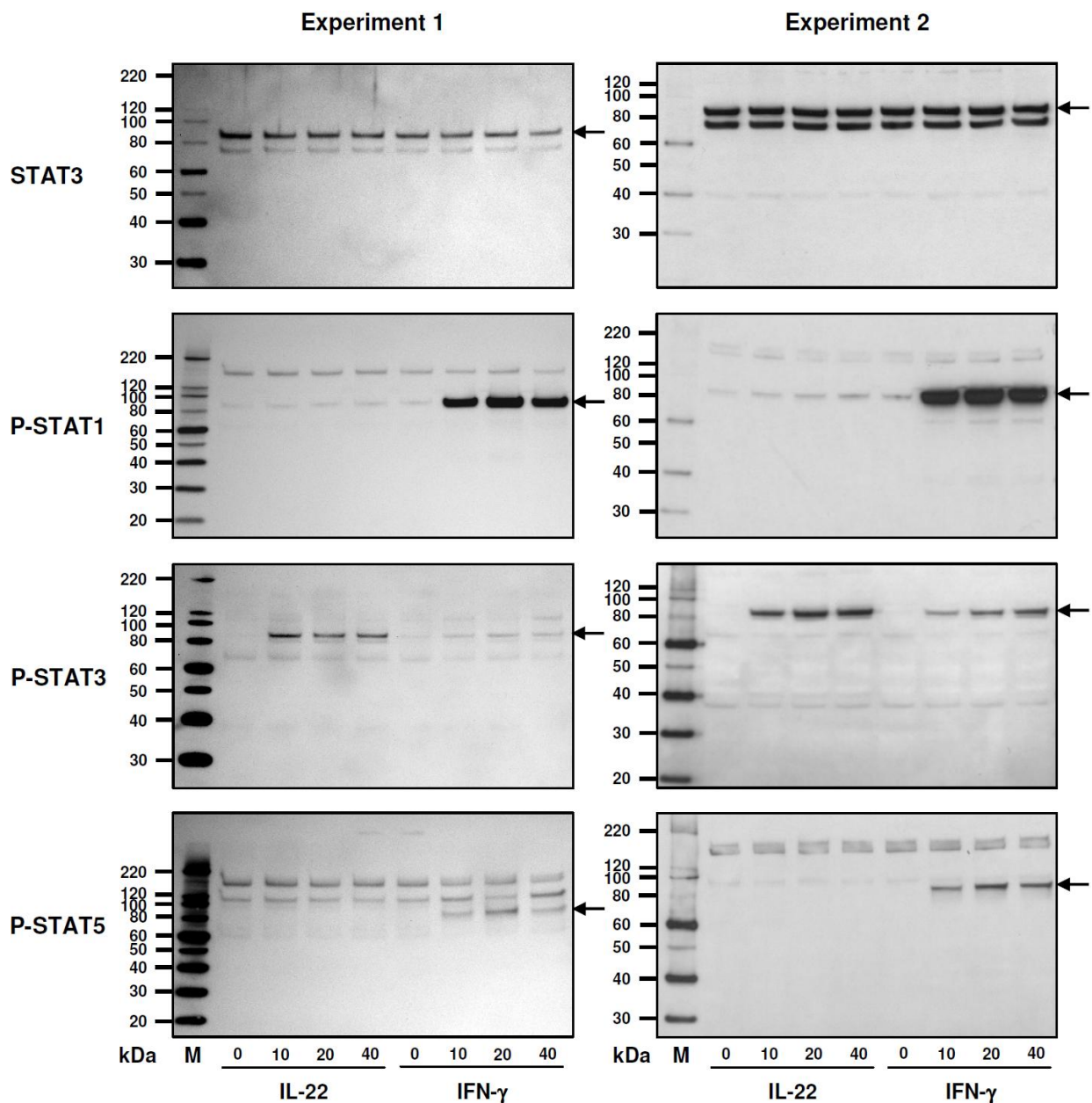
Eine Vorbehandlung der Fibroblasten mit IFN- $\gamma$  führte zu einer geringfügigen Steigerung der Expression von IL-22R1, welche auch nach dem Waschen der Zellen über die nachfolgend getesteten 48h geringfügig erhalten blieb und eine Steigerung der IL-22-Sensitivität bewirken könnte. Hierbei sei erwähnt, daß bereits die Kultivierung *per se* zu einem leichten Anstieg der IL-22R1-Expression führte. TNF- $\alpha$  zeigte nur einen minimalen transienten Effekt auf die IL-22R1-Expression dieser Zellen, welcher durch die anschließende stimulationsfreie Kultur aufgehoben wurde (Abb. 8A).

Hingegen bewirkte weder eine Stimulaton mit IFN- $\gamma$  noch mit TNF- $\alpha$  eine Induktion der Expression von IL-22R1 in Endothelzellen (Abb. 8B). Ähnlich wie es bereits für primäre Keratinozyten gezeigt wurde [109], war die Expression von IL-10R2 in keiner der beiden untersuchten Zelltypen durch IFN- $\gamma$  oder TNF- $\alpha$  regulierbar (Abb. 8A, B).

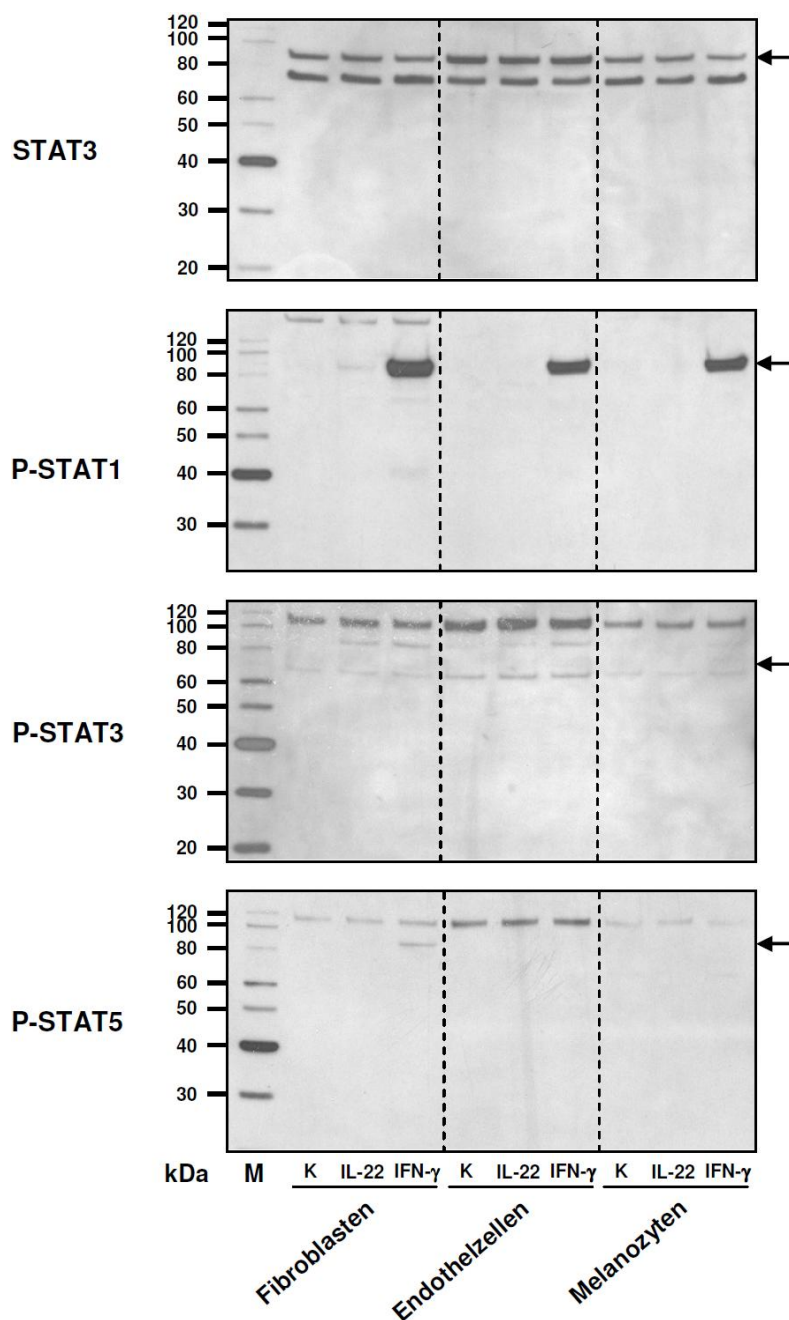
#### **4.2.1.2 Funktionelle Testung der Sensitivität von Gewebezellen der Haut gegenüber IL-22**

Durch unsere Arbeitsgruppe wurde in Vorarbeiten bereits gezeigt, daß IL-22 in primären humanen Keratinozyten nach einer 20-minütigen Stimulationszeit eine klare Tyrosinphosphorylierung von STAT3 bewirkt [109]. Weiterführend sollte in dieser Arbeit die Aktivierung des Jak/STAT-Signalweges durch IL-22 in Keratinozyten näher untersucht und die der weiteren hier untersuchten Zellpopulationen der Haut gefundene geringe (Fibroblasten) oder fehlende (Endothelzellen und Melanozyten) Sensitivität gegenüber IL-22 bestätigt werden. Dazu wurde neben STAT3 die Aktivierung von weiteren Komponenten des Jak/STAT-Signalweges (STAT1, STAT5) mittels Westernblot, in Keratinozyten insbesondere auch nach unterschiedlichen Stimulationszeiten (0, 10, 20, 40 min), untersucht. Die Ergebnisse zeigen, daß bereits eine 10-minütige IL-22-Stimulation zu einer klaren Tyrosinphosphorylierung von STAT3 in Keratinozyten führte, welche bis zu einer 40-minütigen Stimulationszeit klar nachweisbar war (Abb. 9).

In Fibroblasten führte eine 20-minütige IL-22-Stimulation zu einer minimalen Tyrosinphosphorylierung von STAT3 und STAT1 in diesen Zellen (Abb. 10). Dieser Effekt von IL-22 war jedoch nicht vergleichbar mit der klaren Phosphorylierung von STAT3 in Keratinozyten. Hingegen bewirkte IL-22, wie aufgrund der fehlenden IL-22-Rezeptorexpression erwartet, keine Aktivierung von STAT-Molekülen in Endothelzellen oder Melanozyten (Abb. 10). Im Vergleich bewirkte IFN- $\gamma$  eine deutliche Aktivierung der Interferon-typischen STAT1-dominierten Signaltransduktion in allen untersuchten Zellpopulationen (Abb. 9, 10).



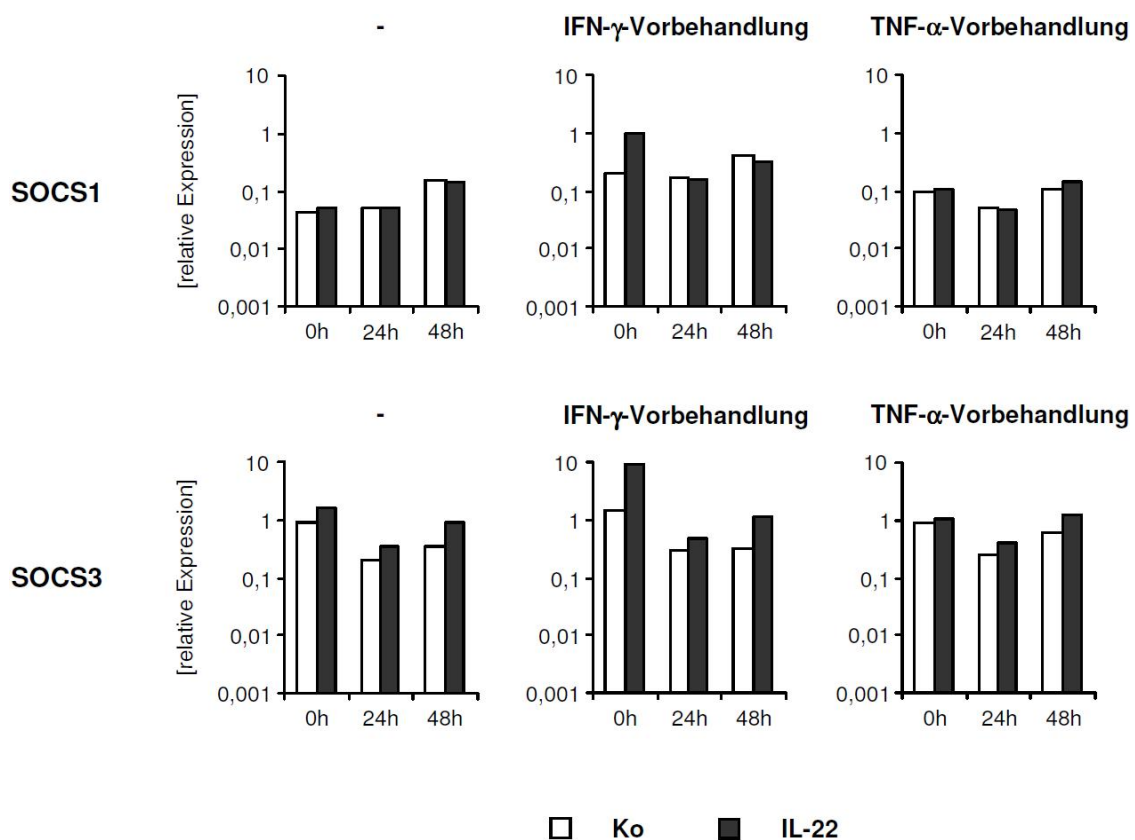
**Abb. 9: Signaltransduktion von IL-22 in Keratinozyten.** Primäre humane Keratinozyten wurden für 10, 20 und 40 min mit rhIL-22 und rhIFN- $\gamma$  stimuliert oder unstimuliert belassen (0 min). In den Zelllysaten wurde das Vorhandensein von Gesamt-STAT3, P-STAT1 (Tyr701), P-STAT3 (Tyr705) und P-STAT5 (Tyr694) mittels Westernblot-Analyse bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse von zwei repräsentativen von insgesamt vier unabhängigen Versuchen mit Keratinozyten unterschiedlicher Spender.



**Abb. 10: Signaltransduktion von IL-22 in Fibroblasten, Endothelzellen und Melanozyten.** Primäre humane dermale Fibroblasten, primäre humane dermale mikrovaskuläre Endothelzellen und primäre humane Melanozyten wurden für 20 min mit und ohne (Kontrolle) rhIL-22 und rhIFN- $\gamma$  stimuliert. In den Zelllysaten wurde das Vorhandensein von Gesamt-STAT3, P-STAT1 (Tyr701), P-STAT3 (Tyr705) und P-STAT5 (Tyr694) mittels Westernblot-Analyse bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse eines Versuches.

Es ist bekannt, daß IL-10 und IL-10-ähnliche Zytokine über die Aktivierung des Jak/STAT-Signalweges eine kurzzeitige Expression der zu der Familie der SOCS gehörenden Proteine SOCS1 und SOCS3 bewirken, welche durch Hemmung der Aktivität Rezeptor-assoziiierter Kinasen und Förderung von deren Ubiquitin-vermittelter Degradation die

Signaltransduktion negativ regulieren [70, 158]. Die Expression dieser Moleküle lässt sich somit als Marker einer IL-22-Wirkung nutzen. Um die Relevanz der gesteigerten IL-22R1-Expression durch eine IFN- $\gamma$ -Vorbehandlung in Fibroblasten zu überprüfen, wurde als nächstes die Sensitivität dieser Zellen gegenüber IL-22 anhand der Expression von SOCS1 und SOCS3 untersucht. Dazu wurden diese Zellen nach einer Vorbehandlung mit IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  sofort oder nach einer anschließenden, 24- oder 48-stündigen stimulationsfreien Kultur für 1 h mit IL-22 stimuliert.



**Abb. 11: Relevanz der IFN- $\gamma$ -bedingten Steigerung der IL-22R1-Expression in Fibroblasten.** Primäre humane dermale Fibroblasten wurden mit und ohne (Kontrolle) rhIFN- $\gamma$  und rhTNF- $\alpha$  für 24h stimuliert, anschließend gewaschen und sofort (0h) oder nach weiteren 24 oder 48 h stimulationsfreier Kultur für 1 h mit und ohne (Kontrolle) rhIL-22 stimuliert. Die Analyse der mRNA-Expression von SOCS1 und SOCS3 erfolgte durch qPCR. Dargestellt ist die Genexpression relativ zu der des Haushaltgens HPRT eines Versuches.

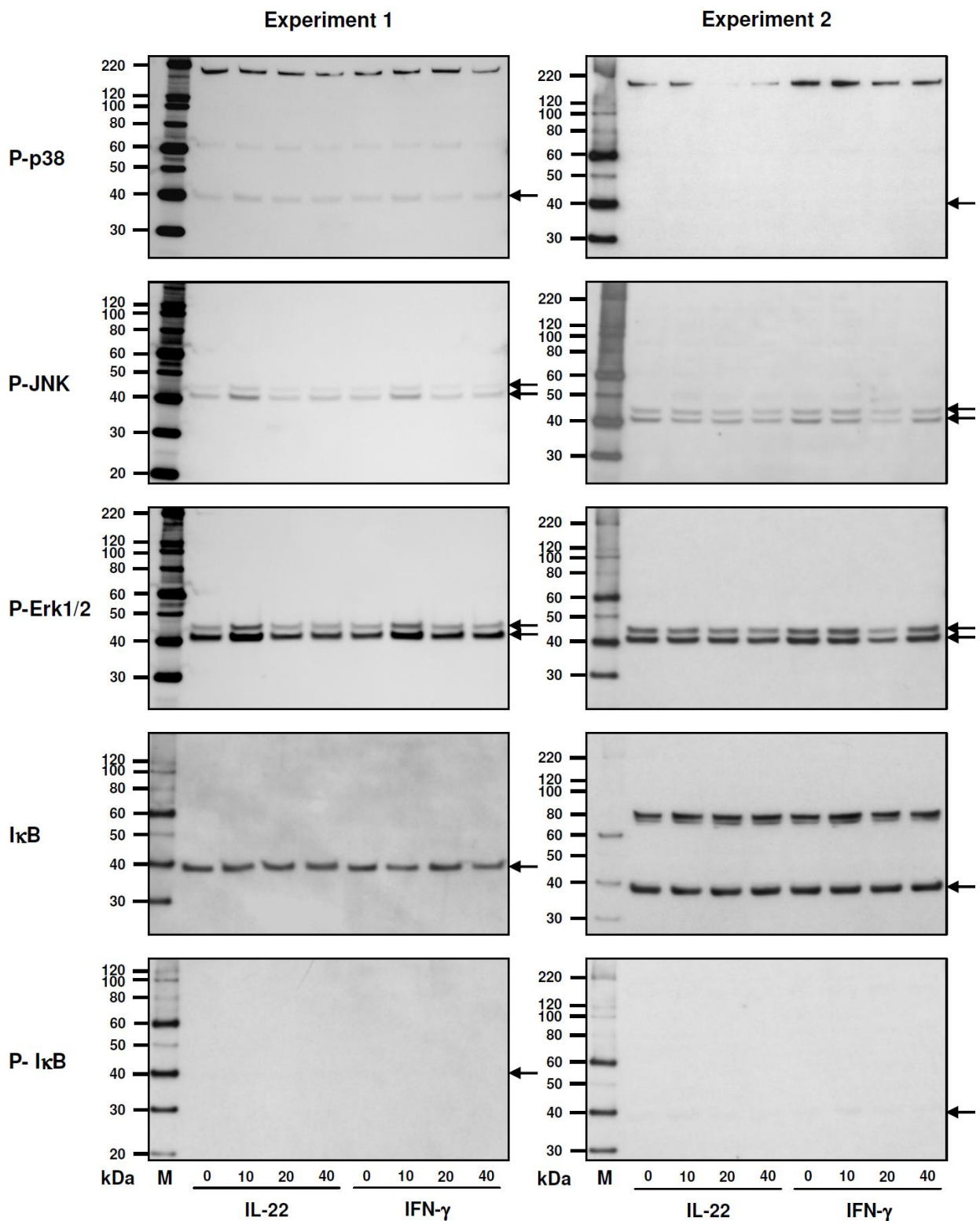
Wie bereits erwartet, führte die Vorbehandlung der Zellen mit IFN- $\gamma$  zu einer IL-22-bedingten gesteigerten Expression von SOCS1 und SOCS3 gegenüber den nicht vorbehandelten Zellen sofern die IL-22-Exposition direkt nach Vorbehandlung erfolgte (Abb. 11). Tatsächlich war dieser Effekt nicht nachhaltig, da dieser 24 und 48 h nach Vorbehandlung nicht mehr sichtbar war (Abb. 11). Im Einklang mit der nur minimalen

transienten Steigerung der IL-22R1-Expression bewirkte eine Vorbehandlung mit TNF- $\alpha$  keine verstärkte Sensitivität der Zellen gegenüber IL-22 (Abb. 11).

Diese Ergebnisse zeigen, daß Fibroblasten aufgrund ihrer geringen konstitutiven IL-22R1-Expression nur eine minimale Sensitivität gegenüber IL-22 aufweisen (Abb. 7). Diese Sensitivität konnte durch eine durch IFN- $\gamma$  erhöhte IL-22R1-Expression gesteigert werden, jedoch war diese Steigerung nicht nachhaltig. Dies lässt vermuten, daß Fibroblasten wahrscheinlich nur unter den Bedingungen eines besonderen Zytokinmilieus zu wesentlichen Zielzellen von IL-22 zählen.

Im Weiteren sollte die durch IL-22 induzierte Signaltransduktion in primären humanen Keratinozyten, als den Hauptzielzellen von IL-22 in der Haut, im Detail analysiert werden. In der Ratten-Hepatomzelllinie H4IIE wurde neben einer STAT-vermittelten Signaltransduktion auch die Aktivierung des MAPK-Signalweges durch IL-22 beschrieben [130]. Daher sollte hier die Aktivierung der drei Hauptwege des MAPK-Signalweges (p38, JNK, Erk1/2), sowie auch die Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalweges (I $\kappa$ B- $\alpha$ ) nach unterschiedlichen IL-22-Stimulationszeiten (0, 10, 20, 40 min) mittels Westernblot untersucht werden. Die Analyse des MAPK-Signalweges in primären humanen Keratinozyten zeigte, daß IL-22 keine Threonin-/Tyrosinphosphorylierung von p38 induzierte (Abb. 12). Im Gegensatz dazu bewirkte IL-22 eine verstärkte Threonin-/Tyrosinphosphorylierung von Erk1/2 und JNK in diesen Zellen bei einem von vier Experimenten mit Keratinozyten von jeweils unterschiedlichen Spendern (Abb. 12). Hinsichtlich der Aktivierung des MAPK-Signalweges zeigte IFN- $\gamma$  eine IL-22-ähnliche Signaltransduktion. IFN- $\gamma$  bewirkte keine Aktivierung von p38, jedoch in Zellen bei einem von vier Experimenten mit Keratinozyten unterschiedlicher Spender eine Phosphorylierung von Erk1/2 und JNK. Weder IL-22 noch IFN- $\gamma$  führten zu einer Aktivierung des NF $\kappa$ B-Signalweges gemessen an einer fehlenden Serinphosphorylierung von I $\kappa$ B- $\alpha$  in Keratinozyten.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, daß trotz einer IL-22-Rezeptorexpression Fibroblasten nur gering sensitiv gegenüber einer IL-22-Stimulation sind. Endothelzellen und Melanozyten sind keine Zielzellen von IL-22. Daher sind Keratinozyten die wichtigsten Zielzellen von IL-22 in der Haut, wobei diese hauptsächlich mit einer Aktivierung des Jak/STAT-Signalweges auf eine IL-22-Stimulation reagieren.



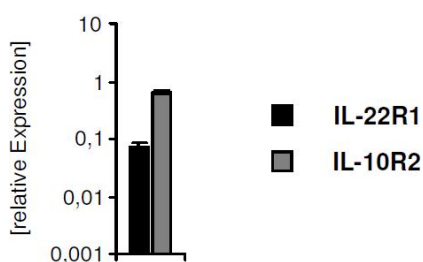
**Abb. 12: Signaltransduktion von IL-22 in Keratinozyten.** Primäre humane Keratinozyten wurden für 10, 20 und 40 min mit rhIL-22 und rhIFN- $\gamma$  stimuliert oder unstimuliert belassen (0 min). In den Zelllysaten wurde das Vorhandensein von P-p38 (Thr180/Tyr182), P-JNK (Thr183/Tyr185), P-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), Gesamt-I $\kappa$ B- $\alpha$  und P-I $\kappa$ B- $\alpha$  (Ser32) mittels Westernblot-Analyse bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse von zwei repräsentativen von insgesamt vier unabhängigen Versuchen mit Keratinozyten unterschiedlicher Spender.

#### 4.2.2 Hepatozyten als Zielzellen von IL-22

Im Einklang mit einer starken IL-22-Rezeptorexpression in der Leber wurde in vorangegangenen Publikationen für Hepatomzelllinien aus Ratte (H4IIE) und Mensch (HepG2) eine starke Expression beider IL-22-Rezeptorketten, sowie eine IL-22-induzierte Signaltransduktion nachgewiesen [27, 69, 130]. Humane Hepatozyten war jedoch bislang noch nicht als Zielzellen validiert. Daher sollte hier zunächst die Expression von IL-22R1 und IL-10R2 in ruhenden primären humanen Hepatozyten untersucht werden. Anschließend wurde die Signaltransduktion von IL-22 unter Nutzung einer humanen Hepatomzelllinie untersucht.

##### 4.2.2.1 IL-22-Rezeptorexpression in Hepatozyten

Tatsächlich wiesen primäre humane Hepatozyten eine starke konstitutive Expression beider IL-22-Rezeptorketten auf (Abb. 13), welche vergleichbar mit der Expression in primären humanen Keratinozyten (Abb. 7) war.



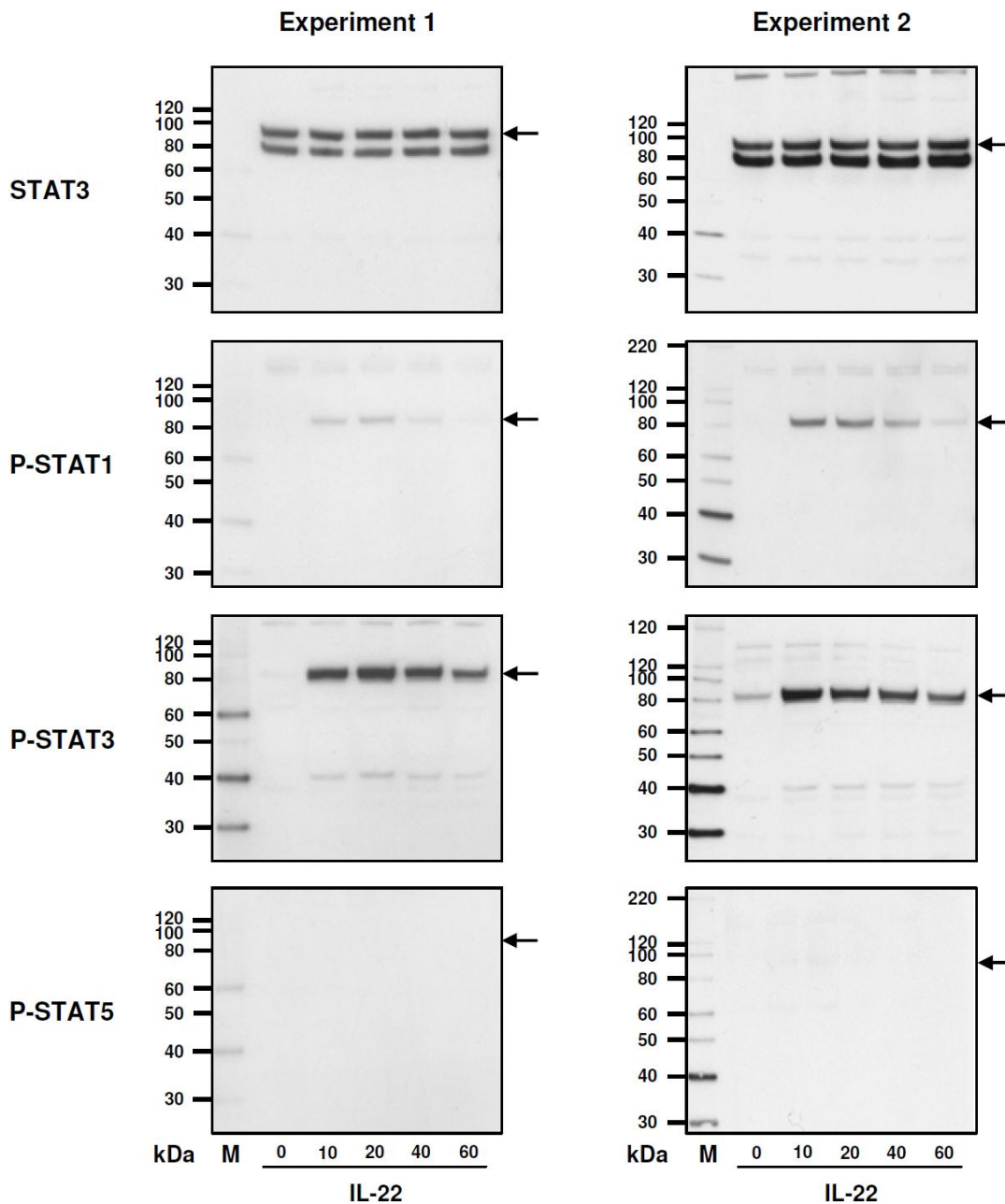
**Abb. 13: Expression von IL-22R1 und IL-10R2 in Hepatozyten.** Primäre humane Hepatozyten wurden lysiert und deren RNA gewonnen. Die Genexpressionsanalyse erfolgte durch qPCR. Dargestellt ist die Genexpression relativ zu der des Haushaltsgens HPRT als Mittelwert ( $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes) von drei unabhängigen Versuchen.

##### 4.2.2.2 Signaltransduktion von IL-22 in Hepatozyten

Primäre humane Hepatozyten proliferieren nicht unter *in vitro*-Bedingungen und waren daher für eine umfassende Signaltransduktionsanalyse nur begrenzt einsetzbar. Da HepG2-Zellen und primäre humane Hepatozyten vergleichbare Level des IL-22-Rezeptors exprimieren (Abb. 13), [27] erfolgte die detaillierte Analyse der hepatozytären Signaltransduktion von IL-22 mittels Westernblot in HepG2-Zellen. Auch in diesen Zellen wurde eine mögliche Aktivierung von Komponenten des Jak/STAT-Signalweges (STAT1, STAT3, STAT5), der drei Hauptwege des MAPK-Signalweges (p38, JNK, Erk1/2), sowie

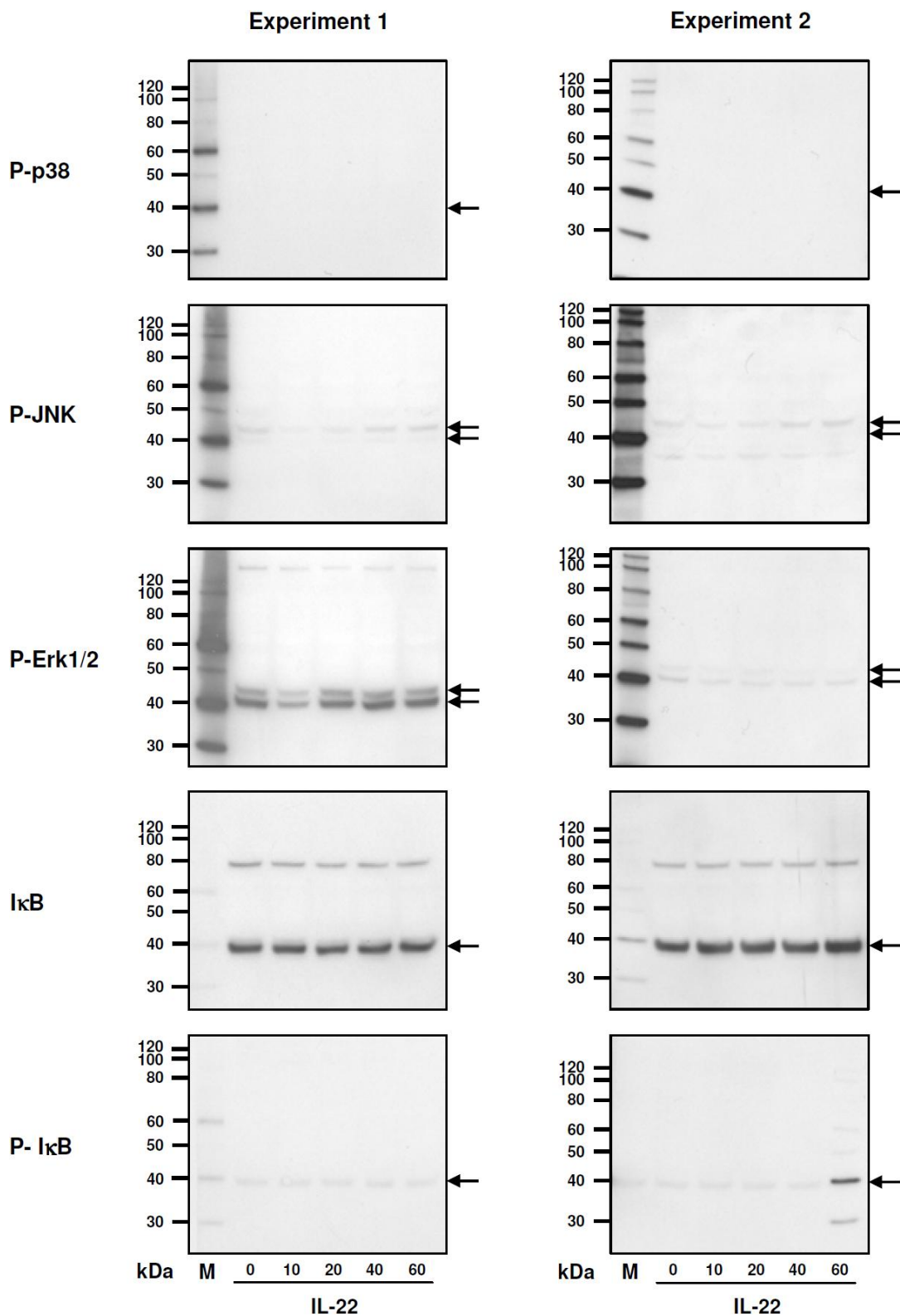


des NF $\kappa$ B-Signalweges ( $\text{I}\kappa\text{B-}\alpha$ ) durch IL-22 nach verschiedenen Stimulationszeiten (10, 20, 40 und 60 min) untersucht.



**Abb. 14: Signaltransduktion von IL-22 in Hepatozyten.** HepG2-Zellen wurden für 10, 20, 40, und 60 min mit rhIL-22 stimuliert oder unstimuliert belassen (0 min). In den Zelllysaten wurde das Vorhandensein von Gesamt-STAT3, P-STAT1 (Tyr701), P-STAT3 (Tyr705) und P-STAT5 (Tyr694) mittels Westernblot-Analyse bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse von zwei repräsentativen von insgesamt vier unabhängigen Versuchen.





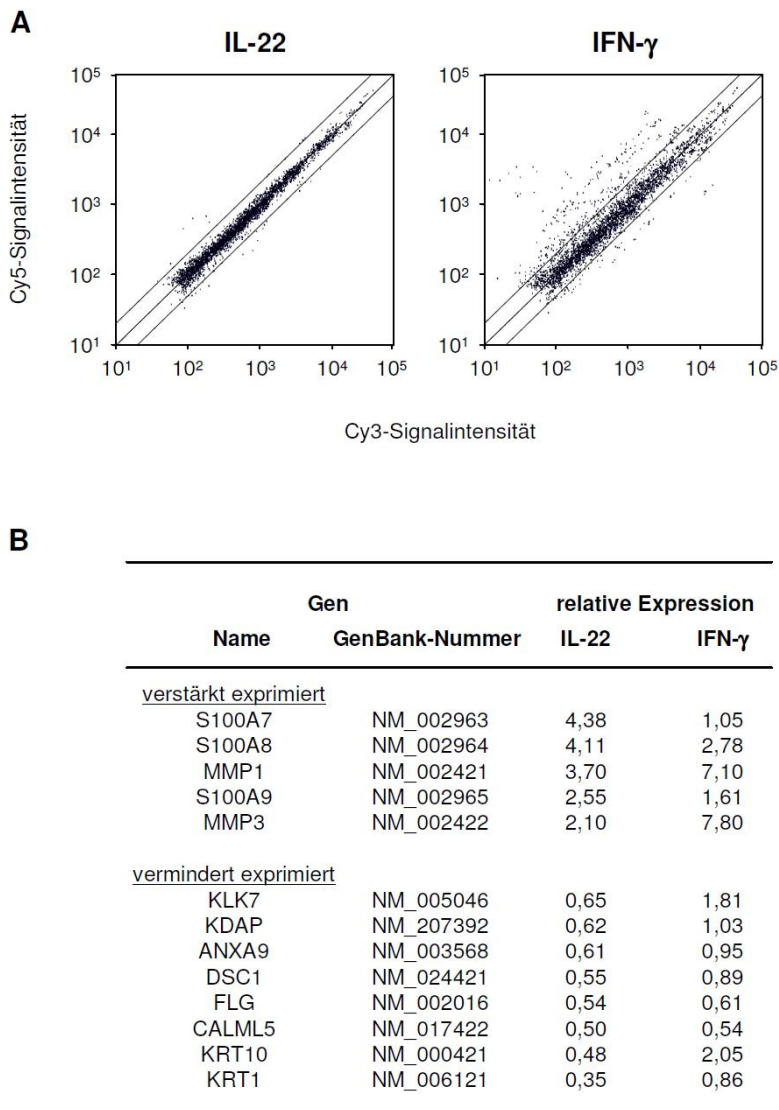
**Abb. 15: Signaltransduktion von IL-22 in Hepatozyten.** HepG2-Zellen wurden für 10, 20, 40, und 60 min mit rhIL-22 stimuliert oder unstimuliert belassen (0 min). In den Zelllysaten wurde das Vorhandensein von P-p38 (Thr180/Tyr182), P-JNK (Thr183/Tyr185), P-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), Gesamt-IκB-α und P-IκB-α (Ser32) mittels Westernblot-Analyse bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse von zwei repräsentativen von insgesamt vier unabhängigen Versuchen.

Wie in Abb. 14 dargestellt ist, bewirkte IL-22 nach einer nur 10-minütigen Stimulation eine klare Tyrosinphosphorylierung von STAT3 sowie eine Tyrosinphosphorylierung von STAT1, wobei die Menge der phosphorylierten Formen von STAT3 und STAT1 mit weiter steigender Stimulationszeit abnahm (Abb. 14). Eine Tyrosinphosphorylierung von STAT5 hingegen wurde zu keinem der analysierten Zeitpunkte durch IL-22 induziert. Im Gegensatz zu der klaren Aktivierung des Jak/STAT-Signalweges bewirkte IL-22 keine Aktivierung des MAPK- und NF $\kappa$ B-Signalweges in HepG2-Zellen (Abb. 15): Eine IL-22-Stimulation dieser Zellen führte weder zu einer Threonin-/Tyrosinphosphorylierung der MAPK p38, Erk1/2 oder JNK, noch zu einer Serinphosphorylierung von I $\kappa$ B- $\alpha$ . Die unphosphorylierte Form von I $\kappa$ B- $\alpha$  war konstitutiv nachweisbar und zu keinem der untersuchten Stimulationszeiten durch IL-22 reguliert (Abb. 15). Die Analyse der Signaltransduktion von IL-22 in HepG2-Zellen zeigt somit, daß IL-22 in diesen Zellen klar durch die Aktivierung des Jak/STAT-Signalweges wirkt, jedoch keine Signaltransduktion über den MAPK- und NF $\kappa$ B-Signalweg aktiviert.

### 4.3 Effekte von IL-22

#### 4.3.1 Effekte von IL-22 auf Keratinozyten

Als der erste Effekt von IL-22 auf Keratinozyten wurde von unserer Arbeitsgruppe gezeigt, daß IL-22 in diesen Zellen die Expression der antimikrobiellen Proteine  $\beta$ -Defensin(BD)-2 und BD3 verstärkt [109]. Diese Arbeit zeigte weiter, daß IL-22 keinen Effekt auf die untersuchten Parameter hinsichtlich einer Proliferationsregulation und Apotoseregulation in diesen Zellen ausübt. Um möglichst die Gesamtheit der Effekte von IL-22 auf Keratinozyten zu erfassen, sollte in dieser Arbeit eine breite Analyse mittels eines Haut-spezifischen Genexpressionsarrays untersucht werden. In diese Untersuchung wurde als Vergleich IFN- $\gamma$  einbezogen, dessen Effekte auf Keratinozyten in der Literatur gut beschrieben sind [159]. Dazu wurden primäre humane Keratinozyten für 42 h mit IL-22 bzw. IFN- $\gamma$  stimuliert oder unstimuliert belassen, deren RNA gewonnen und während der Umschreibung in cDNA mittels eines grünen (Cy3, Kontrolle) oder roten (Cy5, IL-22/IFN- $\gamma$ ) Fluoreszenzfarbstoffes markiert. Die simultane Hybridisierung der markierten cDNA von unstimulierter und stimulierter Probe erfolgte als Quadruplikat auf einen PIQOR™ SkinPatho-Microarray. Die Ergebnisse der resultierenden Fluoreszenzintensitäten beider Farbstoffe sind in Abb. 16A als Punktwolkendiagramm dargestellt, wobei jeder Punkt ein einzelnes Oligonukleotid (Gen) repräsentiert.



**Abb. 16: Genexpressionsprofil von IL-22 in Keratinozyten.** A, Primäre humane Keratinozyten wurden für 42 h mit rhIL-22 und rhIFN- $\gamma$  stimuliert. Die gewonnene mRNA wurde während der cDNA-Synthese mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cyanin-3 (Cy3) (Kontrolle) oder Cyanin-5 (Cy5) (IL-22 bzw. IFN- $\gamma$ ) markiert und simultan auf einen Haut-spezifischen Genexpressionsarray hybridisiert. A, Dargestellt sind die Cy3- und Cy5-Signalintensitäten als Punktwolkendiagramm eines repräsentativen Versuches, wobei jeder Punkt ein einzelnes Gen repräsentiert. B, Die durch IL-22 und IFN- $\gamma$  regulierte Genexpression wurde als Ratio der relativen Cy5-Intensität und der relativen Cy3-Intensität ermittelt und als relative Expression von zwei unabhängigen Versuchen (Mittelwert) dargestellt. Eine Regulation der Genexpression wurde bei einer relativen Expression von mindestens 1,5 (verstärkt exprimiert) oder wenigstens 0,7 (vermindert exprimiert) gewertet.

Die Auftragung der Cy5-Intensität auf der Y-Achse gegen die Cy3-Intensität auf der X-Achse bewirkt eine Anordnung von verstärkt exprimierten Genen im linken oberen Quadranten und von vermindert exprimierten Genen im rechten unteren Quadranten der in Abb. 16A gezeigten Darstellung. Eine Regulation der Genexpression wurde bei einer relativen Expression von mindestens 1,5 oder wenigstens 0,7 gewertet.

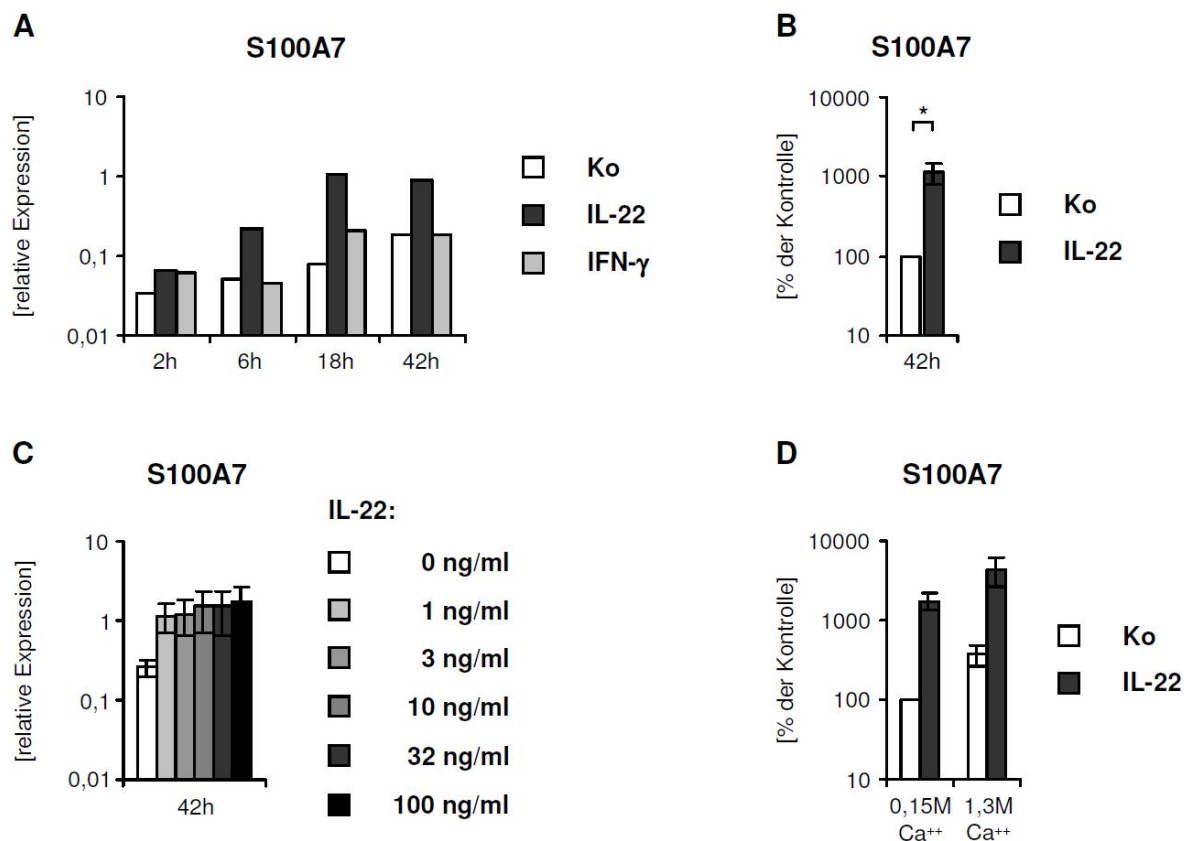
Die Ergebnisse der Genexpressionsprofilanalyse zeigen, daß IL-22 im Vergleich zu IFN- $\gamma$  die Expression von nur sehr wenigen Genen in Keratinozyten regulierte. Von den insgesamt 1126 untersuchten Genen war durch IL-22 die Expression von fünf Genen verstärkt reguliert und von acht Genen reduziert (Abb. 16B). IFN- $\gamma$  bewirkte die Regulation der Expression von 138 Genen, von denen 70 verstärkt und 68 reduziert exprimiert waren (Abb. 16B). Zu den Genen, deren Expression durch IL-22 verstärkt war, zählen S100A7 (Psoriasin), S100A8 (Calgranulin A), Matrix Metalloproteinase (MMP)1, S100A9 (Calgranulin B) und MMP3. In ihrer Expression durch IL-22 vermindert waren Kallikrein 7 (KLK7), Keratinocyte differentiation associated protein (KDAP), Annexin A9 (ANXA9), Desmocollin 1 (DSC1), Profilaggrin (FLG), Calmodulin like 5 (CALML5), Keratin (KRT)10 und KRT1.

Diese durch IL-22 in ihrer Genexpression regulierten Moleküle lassen sich in drei funktionelle Gruppen einteilen. IL-22 steigerte die Expression von antimikrobiellen Proteinen (S100A7, S100A8, S100A9), verminderte die Expression von mit der terminalen Differenzierung assoziierten Proteinen (KLK7, KDAP, DSC1, FLG, CALML5, KRT10, KRT1) und regulierte die Expression von mobilitäts- und migrationsassoziierten Proteinen (MMP1, MMP3, ANXA9). Diese durch IL-22 regulierte Genexpression sollte somit zu einer verstärkten antimikrobiellen Abwehr, einer verminderten terminalen Differenzierung von Keratinozyten und einer verstärkten Mobilität von Zellen führen. Interessanterweise sind diese Keratinozytenfunktionen in ähnlicher Weise in Keratinozyten läsionaler Haut bei der Psoriasis verändert [156]. Einige der durch IL-22 in ihrer Expression regulierten Gene waren in gleicher Weise durch IFN- $\gamma$  reguliert. So war die Expression von antimikrobiellen Proteinen etwas weniger stark und von mobilitätsassoziierten Proteinen stärker durch IFN- $\gamma$  im Vergleich zu IL-22 reguliert.

Im Gegensatz zu IL-22 waren einige mit der terminalen Differenzierung assoziierten Gene durch IFN- $\gamma$  verstärkt exprimiert (KRT10, KLK7). Weiter zählen zu den Genen, deren Expression durch IFN- $\gamma$  jedoch nicht durch IL-22 reguliert war, vor allem solche welche eine Rolle bei der Antigenpräsentation spielen (CD74, HLA-DP $\alpha$ , HLA-DR $\alpha$ , HLA-C, HLA-A,  $\beta$ 2-Mikroglobulin, Antigen-Peptidtransporter-1, Proteasom-Untereinheit  $\alpha$ 4, Proteasom-Untereinheit  $\beta$ 10) sowie Chemokine, Zytokine und deren Rezeptoren (CCL2, CCL3, CCL13, CXCL8, CXCL9, CXCL14, CXCL16, IL-1 $\beta$ , IL-9, IL-1R2, IL-8R2), Adhäsionsmoleküle (CD47, CD54) und Transkriptionsfaktoren (Interferon regulatory factor 1, STAT1).

Von den Genen, deren Expression durch IL-22 in Keratinozyten reguliert war, sollte im Weiteren der Effekt von IL-22 auf die Expression von je einem Vertreter der drei funktionellen Gruppen (S100A7, CALML5, MMP1) näher untersucht werden. Dazu wurden primäre humane Keratinozyten mit IL-22 stimuliert oder unstimuliert belassen und

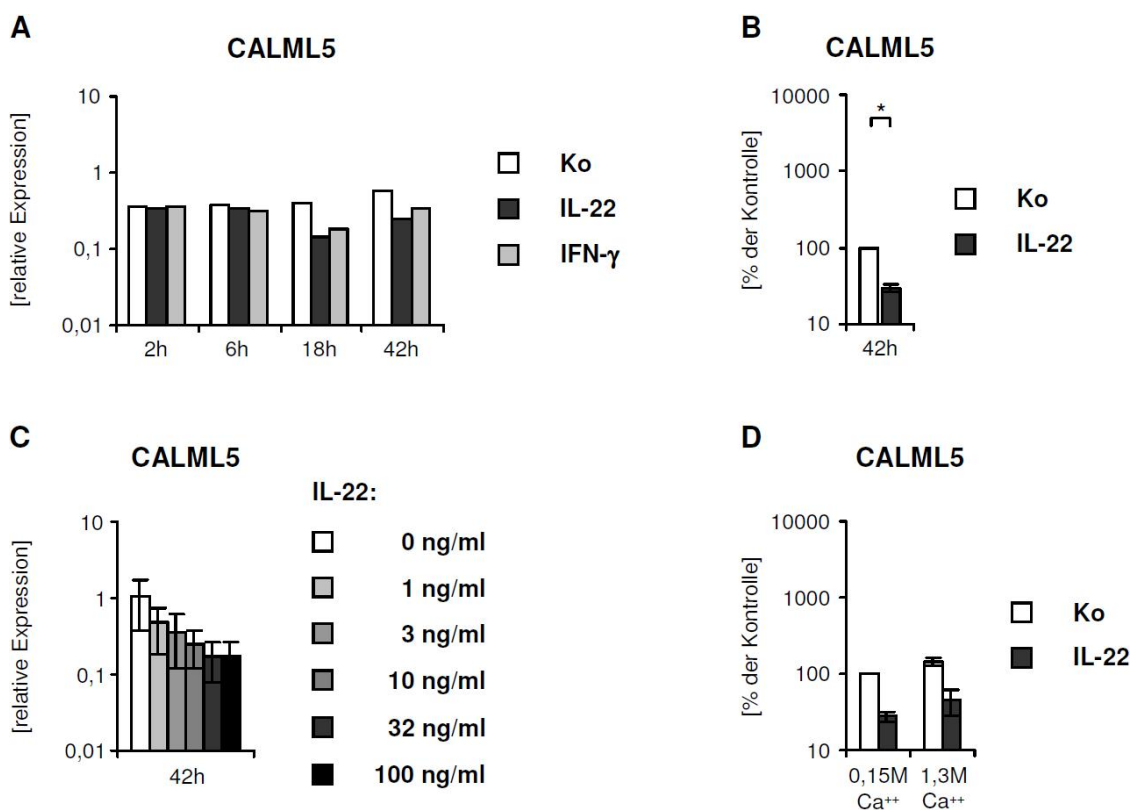
deren mRNA-Expression von S100A7, CALML5 und MMP1 analysiert. Hierbei konnte der Effekt von IL-22 auf die Expression aller drei Gene klar mittels qPCR bestätigt werden.



**Abb. 17: Regulation der Expression von S100A7 durch IL-22 in Keratinozyten.** A, Primäre humane Keratinozyten wurden für 2, 6, 18 und 42 h mit und ohne (Kontrolle) rhIL-22 und rhIFN- $\gamma$  stimuliert. Die Genexpressionsanalyse erfolgte durch qPCR. Dargestellt ist die Genexpression relativ zu der des Haushaltsgens HPRT. B, Primäre humane Keratinozyten wurden für 42 h mit und ohne (Kontrolle) rhIL-22 stimuliert. Die Genexpressionsanalyse erfolgte durch qPCR. Dargestellt ist die Genexpression relativ zu der des Haushaltsgens HPRT als % der Kontrolle (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes) von sieben unabhängigen Versuchen. Das Signifikanzniveau der Zytokin-induzierten Steigerung der S100A7-Expression wurde mittels des Vorzeichen-Rang-Tests für gepaarte Stichproben nach Wilcoxon ermittelt (\* $p \leq 0,05$ ). C, Primäre humane Keratinozyten wurden für 42 h mit steigenden rhIL-22-Konzentrationen (0, 1, 3, 10, 32, 100 ng/ml) stimuliert. Die Genexpressionsanalyse erfolgte durch qPCR. Dargestellt ist die Genexpression relativ zu der des Haushaltsgens HPRT als Mittelwert ( $\pm$  Spannweite des Mittelwertes) von zwei unabhängigen Versuchen. D, Primäre humane Keratinozyten wurden für 18 h mit und ohne (Kontrolle) rhIL-22 in Anwesenheit normaler (0,15 mM) und hoher  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen (1,3 mM) stimuliert. Die Genexpressionsanalyse erfolgte durch qPCR. Dargestellt ist die Genexpression relativ zu der des Haushaltsgens HPRT als % der Kontrolle in Anwesenheit normaler  $Ca^{2+}$ -Konzentrationen (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes) von drei unabhängigen Versuchen.

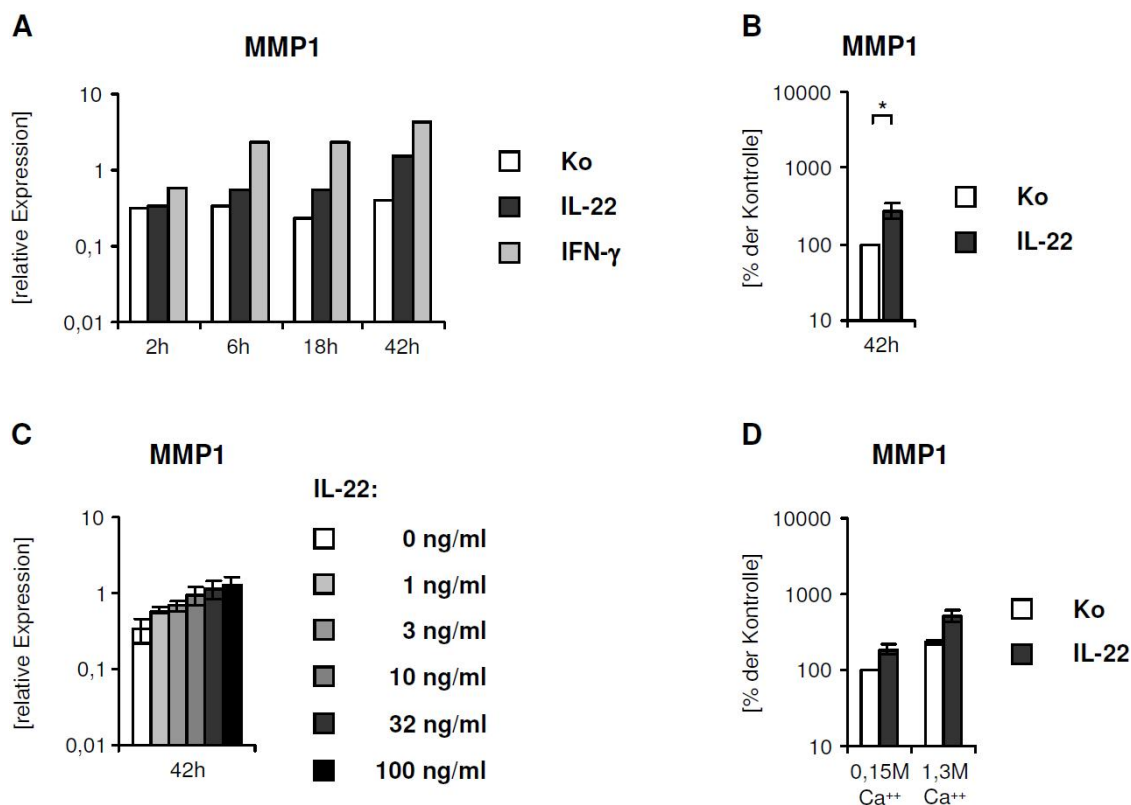
Wie die in Abb. 17 dargestellten Ergebnisse einer kinetischen Analyse zeigen, bewirkte IL-22 bereits nach 6 h eine verstärkte Expression von S100A7 (Abb. 17A). Dieser Effekt war bis 42 h zeitabhängig reguliert, wobei die stärkste durch IL-22-induzierte Expression von S100A7 nach 18 h zu verzeichnen war (Abb. 17A). Anhand einer größeren Anzahl von Experimenten konnte ein signifikanter Effekt (\* $p < 0,05$ ) durch IL-22 nach 42 h

Stimulationszeit nachgewiesen werden (Abb. 17B). Weiterhin war die IL-22-induzierte verstärkte Expression von S100A7 dosisabhängig reguliert, wobei ein maximaler Effekt ab 10 ng/ml IL-22 erreicht werden konnte (Abb. 17C). IFN- $\gamma$  bewirkte im Einklang mit den Ergebnissen der Genexpressionsprofilanalyse eine verstärkte, jedoch im Vergleich zu IL-22 geringere S100A7-Expression (Abb. 17A). Um eine mögliche Abhängigkeit des IL-22-Effektes von dem Differenzierungszustand der Keratinozyten zu untersuchen, wurden anschließend primäre Keratinozyten in Anwesenheit normaler (0,15 M) und erhöhter (d.h. Differenzierungs-fördernder)  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen (1,3 M) für 18 h mit IL-22 stimuliert oder unstimuliert belassen. Eine durch  $\text{Ca}^{2+}$  geförderte Differenzierung führte zwar zu einer Steigerung der konstitutiven S100A7-Expression, bewirkte jedoch keine klare Modulation der Stärke des IL-22-Effektes hinsichtlich der Genexpressionsregulation [(1760 % der Kontrolle (0,15 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) versus 1187% der Kontrolle (1,3 mM  $\text{Ca}^{2+}$ )] (Abb. 17D).



**Abb. 18: Regulation der Expression von CALML5 durch IL-22 in Keratinozyten.** A, Primäre humane Keratinozyten wurden für 2, 6, 18 und 42 h mit und ohne (Kontrolle) rhIL-22 und rhIFN- $\gamma$  stimuliert. Die Genexpressionsanalyse erfolgte durch qPCR. Dargestellt ist die Genexpression relativ zu der des Haushaltsgens HPRT. B, Primäre humane Keratinozyten wurden für 42 h mit und ohne (Kontrolle) rhIL-22 stimuliert. Die Genexpressionsanalyse erfolgte durch qPCR. Dargestellt ist die Genexpression relativ zu der des Haushaltsgens HPRT als % der Kontrolle (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes) von sieben unabhängigen Versuchen. Das Signifikanzniveau der Zytokin-induzierten Verminderung der CALML5-Expression wurde mittels des Vorzeichen-Rang-Tests für gepaarte Stichproben nach Wilcoxon ermittelt (\*p  $\leq$  0,05).

0,05). C, Primäre humane Keratinozyten wurden für 42 h mit steigenden rhIL-22-Konzentrationen (0, 1, 3, 10, 32, 100 ng/ml) stimuliert. Die Genexpressionsanalyse erfolgte durch qPCR. Dargestellt ist die Genexpression relativ zu der des Haushaltsgens HPRT als Mittelwert ( $\pm$  Spannweite des Mittelwertes) von zwei unabhängigen Versuchen. D, Primäre humane Keratinozyten wurden für 18 h mit und ohne (Kontrolle) rhIL-22 in Anwesenheit normaler (0,15 mM) und hoher  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen (1,3 mM) stimuliert. Die Genexpressionsanalyse erfolgte durch qPCR. Dargestellt ist die Genexpression relativ zu der des Haushaltsgens HPRT als % der Kontrolle in Anwesenheit normaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes) von drei unabhängigen Versuchen.



**Abb. 19: Regulation der Expression von MMP1 durch IL-22 in Keratinozyten.** A, Primäre humane Keratinozyten wurden für 2, 6, 18 und 42 h mit und ohne (Kontrolle) rhIL-22 und rhIFN- $\gamma$  stimuliert. Die Genexpressionsanalyse erfolgte durch qPCR. Dargestellt ist die Genexpression relativ zu der des Haushaltsgens HPRT. B, Primäre humane Keratinozyten wurden für 42 h mit und ohne (Kontrolle) rhIL-22 stimuliert. Die Genexpressionsanalyse erfolgte durch qPCR. Dargestellt ist die Genexpression relativ zu der des Haushaltsgens HPRT als % der Kontrolle (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes) von sieben unabhängigen Versuchen. Das Signifikanzniveau der Zytokin-induzierten Steigerung der MMP1-Expression wurde mittels des Vorzeichen-Rang-Tests für gepaarte Stichproben nach Wilcoxon ermittelt (\* $p \leq 0,05$ ). C, Primäre humane Keratinozyten wurden für 42 h mit steigenden rhIL-22-Konzentrationen (0, 1, 3, 10, 32, 100 ng/ml) stimuliert. Die Genexpressionsanalyse erfolgte durch qPCR. Dargestellt ist die Genexpression relativ zu der des Haushaltsgens HPRT als Mittelwert ( $\pm$  Spannweite des Mittelwertes) von zwei unabhängigen Versuchen. D, Primäre humane Keratinozyten wurden für 18 h mit und ohne (Kontrolle) rhIL-22 in Anwesenheit normaler (0,15 mM) und hoher  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen (1,3 mM) stimuliert. Die Genexpressionsanalyse erfolgte durch qPCR. Dargestellt ist die Genexpression relativ zu der des Haushaltsgens HPRT als % der Kontrolle in Anwesenheit normaler  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentrationen (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes) von drei unabhängigen Versuchen.

Der Effekt von IL-22 auf die Expression von CALML5 war ebenfalls zeitabhängig reguliert, wobei eine deutliche Verminderung der CALML5-Expression nach einer 18-stündigen

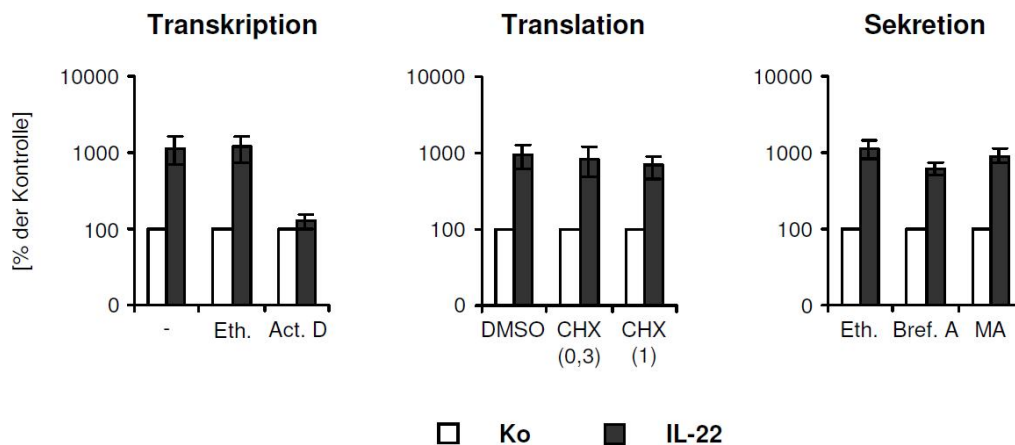
IL-22-Stimulation nachweisbar war (35,3 % der Kontrolle) (Abb. 18A) und bis zu 42 h IL-22-Stimulation anhielt. Dieser Effekt war für eine 42-stündige Stimulation signifikant (\* $p < 0,05$ ) (Abb. 18B). Weiterhin war die CALML5-Expression nach 42 h durch IL-22 dosisabhängig vermindert, wobei eine Konzentration ab 32 ng/ml IL-22 einen maximalen Effekt zeigte (Abb. 18C). Eine verstärkte Differenzierung der Keratinozyten durch eine Kultur in Anwesenheit einer erhöhten  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration bewirkte auch hier eine Steigerung der konstitutiven CALML5-Expression, jedoch keine Veränderung der Stärke der Genexpressionsregulation durch IL-22 [(28 % der Kontrolle (0,15 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) versus 31 % der Kontrolle (1,3 mM  $\text{Ca}^{2+}$ )] (Abb. 18D).

Hinsichtlich der mRNA-Expression von MMP1 bewirkte IL-22 eine klare Steigerung der Expression bereits nach einer 6-stündigen Stimulationszeit, welche kontinuierlich mit der Zeit bis 42 h anstieg (Abb. 19A). Eine maximale und signifikante IL-22-induzierte MMP1-Expression wurde durch eine 42-stündige Stimulation erzielt (Abb. 19A, B). Hierbei war der durch  $\text{IFN-}\gamma$  induzierte Effekt etwas stärker als der von IL-22, was die Ergebnisse der Genexpressionsprofilanalyse bestätigt. Die Steigerung der MMP1-Expression war dosisabhängig durch IL-22 reguliert, wobei selbst durch die höchste hier verwendete IL-22-Konzentration noch eine Expressionssteigerung gegenüber der nächst niedrigeren IL-22-Konzentration und somit kein Wirkungsplateau im höheren Konzentrationsbereich erreicht wurde (Abb. 19C). Eine differenzierungsfördernde erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration im Kulturmedium führte auch hier zu einem Anstieg der konstitutiven Expression von MMP1, jedoch nicht zu einer klaren Modulation des IL-22-Effektes [(188 % der Kontrolle (0,15 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) versus 227 % der Kontrolle (1,3 mM  $\text{Ca}^{2+}$ )] (Abb. 19D).

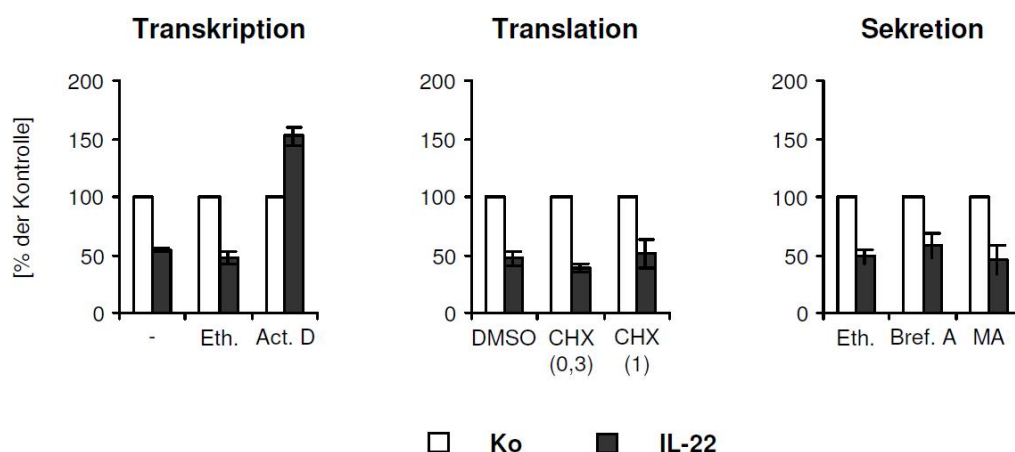
Als nächstes sollten die Mechanismen der IL-22-induzierten differentiellen Genexpression von S100A7, CALML5 und MMP1 in primären Keratinozyten näher untersucht werden. Um aufzuklären, ob IL-22 die Expression dieser Gene transkriptionell und ob direkt oder indirekt durch einen sekundären Mediator reguliert, wurden primäre Keratinozyten während der IL-22-Stimulation in Anwesenheit von Inhibitoren der Transkription [Actinomycin D (Act D)], Translation [Cycloheximid (CHX)] und der klassischen [Brefeldin A (Bref A)] und nichtklassischen [Methylamin (MA)] Sekretion kultiviert [160, 161, 162, 163]. Hinsichtlich der IL-22-induzierten S100A7-Expression bewirkte die Anwesenheit von Act D eine deutliche Hemmung des IL-22-Effektes (Abb. 20). Hingegen war die durch IL-22 induzierte S100A7-Expression nicht durch die Anwesenheit von CHX, Bref A oder MA hemmbar und damit unabhängig von einer Proteinneusynthese und Sekretion (Abb. 20), was auf einen transkriptionell regulierten und direkten IL-22-Effekt hinweist. Der IL-22-Effekt auf die Expression von CALML5 war ebenfalls durch die Anwesenheit des Transkriptionsinhibitors Act D vermindert (Abb. 21). Die fehlende Hemmbarkeit des IL-22-Effektes durch die verwendeten Inhibitoren der Translation und Sekretion zeigt, daß IL-22



die Expression von CALML5 transkriptionell, direkt und nicht durch einen sekundären Mediator reguliert (Abb. 21).

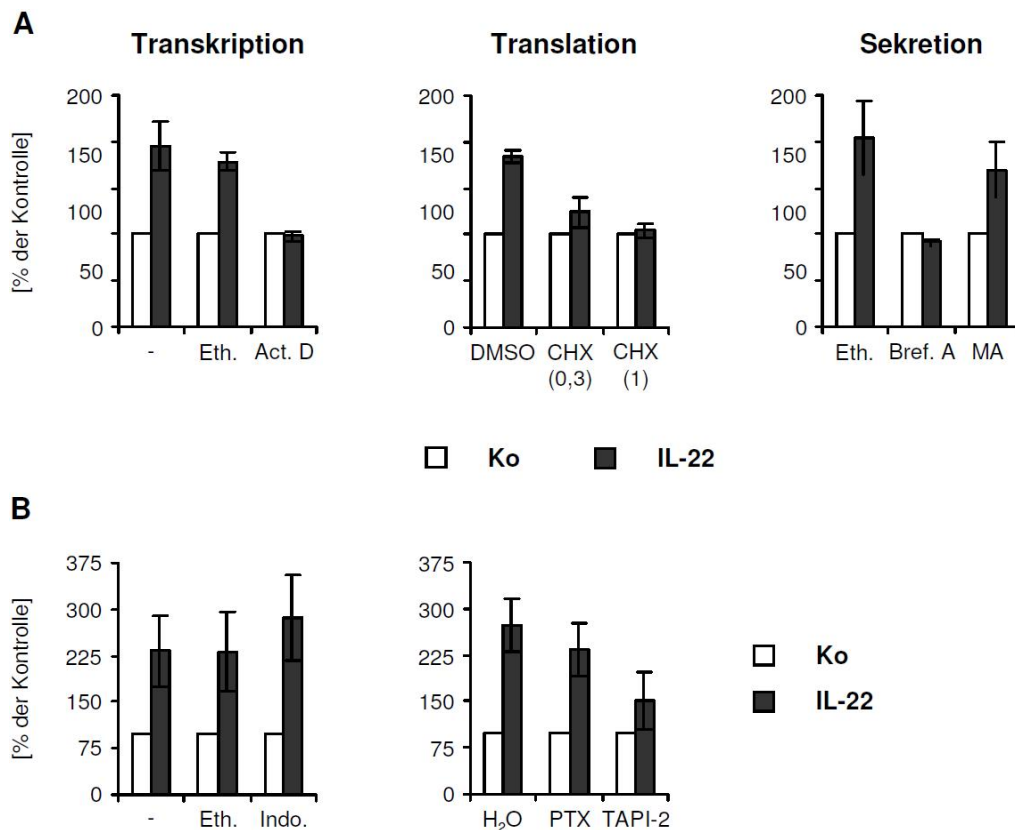


**Abb. 20: Mechanismen der IL-22-induzierten Steigerung der S100A7-Expression in Keratinozyten.** Primäre humane Keratinozyten wurden für 18 h in Anwesenheit von Act D, CHX, Bref A und MA oder der entsprechenden Lösungsmittelkontrollen (Ethanol, DMSO) mit und ohne (Kontrolle) rhIL-22 stimuliert. Die Genexpressionsanalyse erfolgte durch qPCR. Dargestellt ist die Genexpression relativ zu der des Haushaltsgens HPRT als % der Kontrolle (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes) von drei unabhängigen Versuchen.



**Abb. 21: Mechanismen der IL-22-induzierten Verminderung der CALML5-Expression in Keratinozyten.** Primäre humane Keratinozyten wurden für 18 h in Anwesenheit von Act D, CHX, Bref A und MA oder der entsprechenden Lösungsmittelkontrollen (Ethanol, DMSO) mit und ohne (Kontrolle) rhIL-22 stimuliert. Die Genexpressionsanalyse erfolgte durch qPCR. Dargestellt ist die Genexpression relativ zu der des Haushaltsgens HPRT als % der Kontrolle (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes) von drei unabhängigen Versuchen.

Die Steigerung der Expression von MMP1 war durch IL-22 transkriptionell reguliert, wie die Hemmung des IL-22-Effektes durch die Anwesenheit von Act D zeigt (Abb. 22A). Weiter bewirkte jedoch auch die Anwesenheit des Translationsinhibitors CHX eine dosisabhängige Hemmung des IL-22-Effektes (Abb. 22A). Bref A, nicht jedoch MA bewirkte ebenfalls eine Hemmung des IL-22-Effektes auf die MMP1-Expression (Abb. 22A).



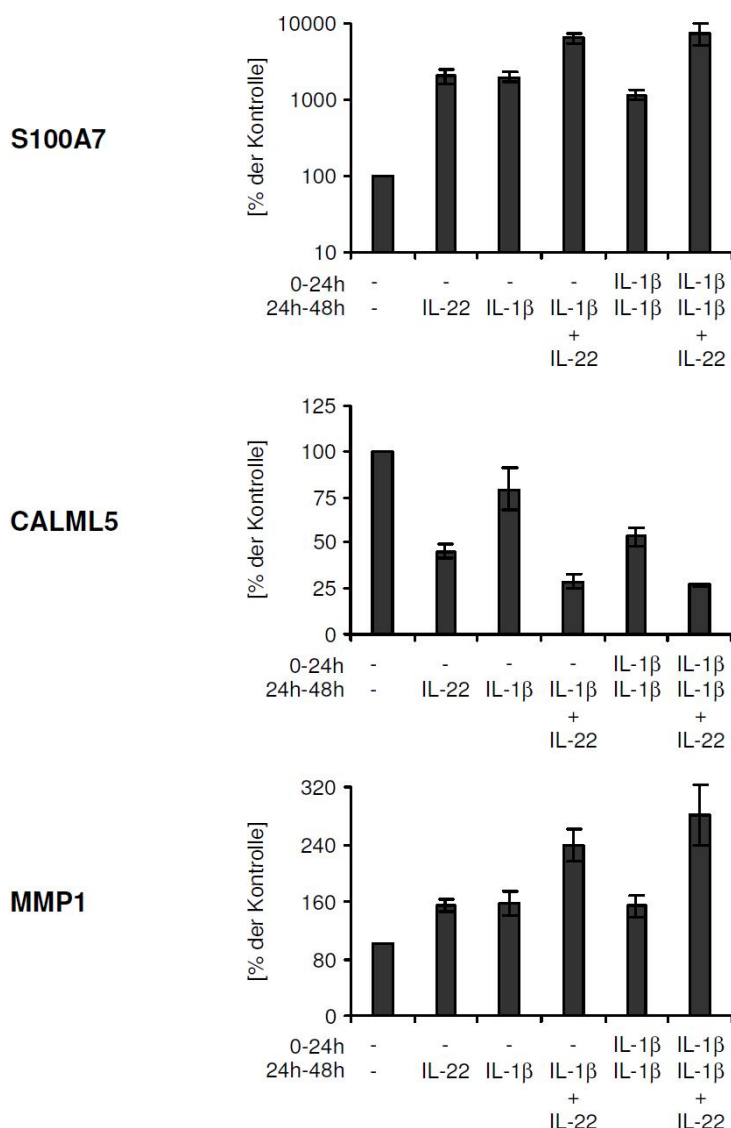
**Abb. 22: Mechanismen der IL-22-induzierten Steigerung der MMP1-Expression in Keratinozyten.** A, Primäre humane Keratinozyten wurden für 18 h in Anwesenheit von Act D, CHX, Bref A und MA oder der entsprechenden Lösungsmittelkontrollen (Ethanol, DMSO) mit und ohne (Kontrolle) hIL-22 stimuliert. Die Genexpressionsanalyse erfolgte durch qPCR. Dargestellt ist die Genexpression relativ zu der des Haushaltsgens HPRT als % der Kontrolle (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes) von drei unabhängigen Versuchen. B, Primäre humane Keratinozyten wurden für 18 h in Anwesenheit von Indomethacin (Indo), PTX (1  $\mu$ g/ml) und TAPI-2 oder der entsprechenden Lösungsmittelkontrollen (Ethanol, H<sub>2</sub>O bidest) mit und ohne (Kontrolle) rhIL-22 stimuliert. Die Genexpressionsanalyse erfolgte durch qPCR. Dargestellt ist die Genexpression relativ zu der des Haushaltsgens HPRT als % der Kontrolle (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes) von drei unabhängigen Versuchen.

Diese Ergebnisse zeigen, daß die Regulation der MMP1-Expression durch IL-22 indirekt durch die Wirkung eines sekundären, durch Keratinozyten produzierten und klassisch sezernierten Proteins vermittelt wird. Als mögliche autokrin wirkende, diesen IL-22-Effekt-vermittelnde Mediatoren sind sowohl Prostaglandine, Chemokine als auch EGF-Rezeptor-Liganden denkbar. Um diesen Mediator näher zu identifizieren, wurden primäre

Keratinocyten daher während der IL-22-Stimulation in Anwesenheit von Inhibitoren der für die Synthese von Prostaglandinen wichtigen Cyclooxygenase (Indomethacin), der für Chemokinrezeptoren charakteristischen gekoppelten G-Proteine [Pertussis-Toxin (PTX) oder des für die Aktivierung von EGF-Rezeptor-Liganden notwendige „TNF- $\alpha$  converting enzyme“ (TAPI-2) kultiviert. Während Indomethacin und PTX keine klare Wirkung auf die IL-22-induzierte MMP1-Expression zeigte, bewirkte die Anwesenheit von TAPI-2 eine 80%-ige Reduktion des IL-22-Effektes (Abb. 22B). Die IL-22-induzierte MMP1-Expression ist daher wahrscheinlich nicht durch Prostaglandine oder Chemokine, sondern durch die Wirkung eines Liganden der EGF-Rezeptor-Familie vermittelt.

Immunreaktionen zeichnen sich durch ein simultanes Vorhandensein mehrerer Immunmediatoren aus. Daher war es interessant, im Weiteren eine mögliche Synergie zwischen IL-22 und anderen Zytokinen hinsichtlich der Regulation der Expression von S100A7, CALML5 und MMP1 zu untersuchen. Die läsionale Haut von Psoriasis-Patienten beispielsweise weist im Gegensatz zur Haut gesunder Kontrollprobanden neben einer massiven IL-22-Expression und einer hohen IFN- $\gamma$ -Expression sehr hohe Expressionslevel von IL-1 $\beta$  auf [109]. IL-1 $\beta$  ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches unter anderem von Keratinocyten gebildet wird und auch auf diese Zellen wirken kann. Um ein mögliches synergistisches Zusammenwirken von IL-22 und IL-1 $\beta$  zu untersuchen, wurden primäre Keratinocyten mit und ohne IL-1 $\beta$  für 24 h vorstimuliert und anschließend für weitere 24 h mit IL-22 in An- oder Abwesenheit von IL-1 $\beta$  stimuliert. Wie in Abb. 23 dargestellt ist, bewirkte IL-1 $\beta$  sowohl nach einer 24-stündigen, als auch nach einer 48-stündigen Stimulation eine Steigerung der Expression von S100A7 und MMP1, sowie eine Verminderung der Expression von CALML5. Dieser IL-1 $\beta$ -Effekt war hinsichtlich der Expression von S100A7 und CALML5 zeitabhängig reguliert und nach 48 h Stimulation am stärksten ausgeprägt. Interessanterweise induzierte IL-22 eine Steigerung des IL-1 $\beta$ -Effektes sowohl nach 24 h, als auch nach 48 h Stimulation (Abb. 23). IL-22 wirkte hier demnach klar synergistisch mit IL-1 $\beta$  auf die Expression von S100A7, CALML5 und MMP1.

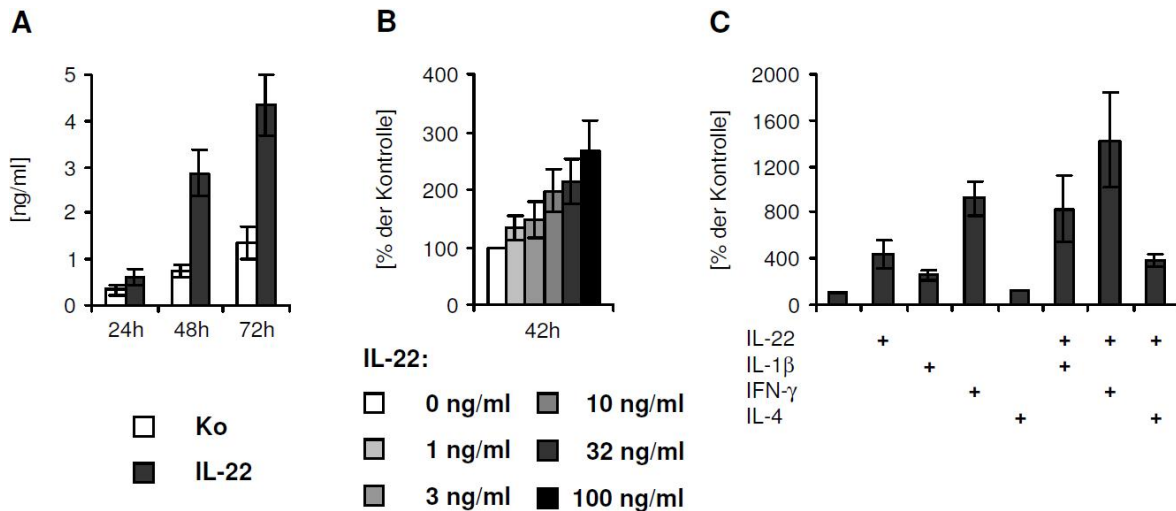
Die in dieser Arbeit beschriebenen Effekte von IL-22 auf primäre Keratinocyten wurden auf der Ebene der mRNA-Expression identifiziert und näher charakterisiert (Abb. 16-22). Im Weiteren sollten die gefundenen IL-22-Effekte auf Proteinebene validiert werden. Da zum Zeitpunkt dieser Arbeit keine kommerziellen quantitativen Proteinnachweissysteme für humanes S100A7 und humanes CALML5 erhältlich waren, beschränkten sich diese Untersuchungen auf die IL-22-induzierte Proteinexpression von MMP1. Gemäß den Ergebnissen der mRNA-Expression induzierte IL-22 auch die Proteinexpression von MMP1 in primären Keratinocyten (Abb. 24).



**Abb. 23: Synergistische Wirkung von IL-22 und IL-1 $\beta$  auf die Expression von S100A7, CALML5 und MMP1 in Keratinozyten.** Primäre humane Keratinozyten wurden mit oder ohne rhIL-1 $\beta$  für 24 h vorstimuliert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und für weitere 24 h ohne oder mit rhIL-22, rhIL-1 $\beta$  und rhIL-22 plus rhIL-1 $\beta$  stimuliert. Die Genexpressionsanalyse erfolgte durch qPCR. Dargestellt ist die Genexpression relativ zu der des Haushaltsgens HPRT als % der Kontrolle (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes) von drei unabhängigen Versuchen.

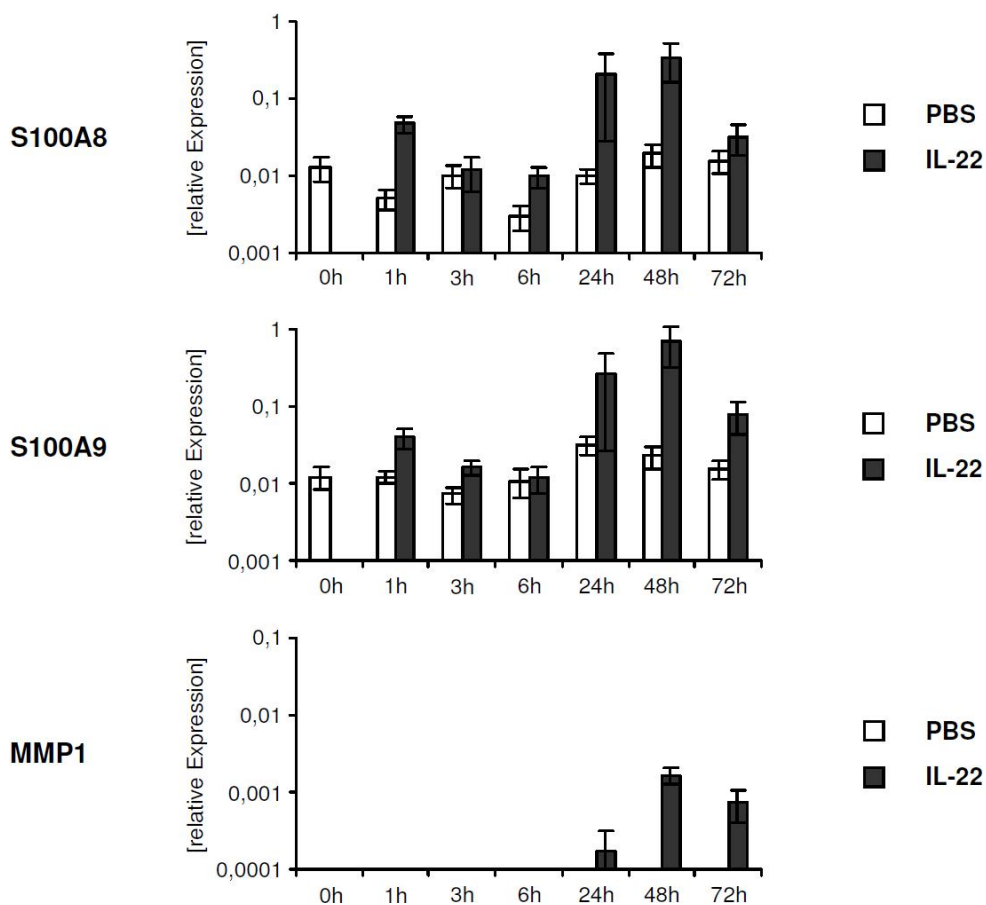
IL-22 induzierte einen zeitabhängigen Anstieg der MMP1-Konzentration im Zellkulturüberstand, was sich in einer Akkumulation von MMP1 auf 320% nach 72 h gegenüber den unstimulierten Zellen zeigte (Abb. 24A). Dieser IL-22-Effekt war dosisabhängig, wobei die höchste MMP1-Produktion durch die höchste verwendete IL-22-Konzentration erzielt wurde (100 ng/ml) (Abb. 24B). Die Untersuchung einer möglichen Synergie von IL-22 mit anderen Zytokinen auf die Produktion von MMP1 zeigte, daß IL-22 sowohl die durch IL-1 $\beta$ -induzierte, als auch die durch IFN- $\gamma$ -induzierte MMP1-Produktion

deutlich steigerte (Abb. 24C). IL-4 hingegen induzierte keine Produktion von MMP1 und bewirkte auch keine Steigerung des IL-22-Effektes (Abb. 24C).



**Abb. 24: Regulation der MMP1-Produktion durch IL-22 in Keratinozyten.** A, Primäre humane Keratinozyten wurden für 24, 48 und 72 h mit oder ohne (Kontrolle) rhIL-22 stimuliert. Die Bestimmung der Konzentration von MMP1 in den gewonnenen Zellkulturüberständen erfolgte mittels ELISA. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen als Mittelwerte ( $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes). B, Primäre humane Keratinozyten wurden für 42 h mit steigenden rhIL-22-Konzentrationen (0, 1, 3, 10, 32, 100 ng/ml) stimuliert. Die Bestimmung der Konzentration von MMP1 in den gewonnenen Zellkulturüberständen erfolgte mittels ELISA. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen als % der Kontrolle (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes). C, Primäre humane Keratinozyten wurden für 48 h mit rhIL-22, rhIL-1 $\beta$ , rhIFN- $\gamma$ , IL-4 oder mit einer Kombinationen von rhIL-22 und rhIL-1 $\beta$ , rhIFN- $\gamma$  oder rhIL-4 stimuliert oder unstimuliert belassen (Kontrolle). Die Bestimmung der Konzentration von MMP1 in den gewonnenen Zellkulturüberständen erfolgte mittels ELISA. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen als % der Kontrolle (Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes).

Abschließend sollte untersucht werden, ob die *in vitro*-Effekte von IL-22 auf Keratinozyten auch *in vivo* zu beobachten sind. Dazu wurde weiblichen Balb/c-Mäusen eine einmalige Dosis von 1  $\mu$ g IL-22 pro 20 g Körpergewicht oder ein entsprechendes Volumen PBS i.p. appliziert und es wurde zu verschiedenen Zeitpunktionen nach IL-22-Applikation Haut entnommen und deren mRNA Expression von S100A8, S100A9 und MMP1 analysiert. Die Ergebnisse zeigen, daß S100A8 und S100A9 konstitutiv in der Haut der Mäuse exprimiert waren (Abb. 25). Eine IL-22-Applikation induzierte einen Anstieg der Expression von S100A8 und S100A9 bereits 1 h bis 72 h nach Applikation (Abb. 25). Eine maximale Expression von S100A8 und S100A9 war dabei 48 h nach IL-22-Applikation erreicht (Abb. 25). Im Gegensatz zu der konstitutiven kutanen Expression von S100A8 und S100A9 war die Expression von MMP1 nur in der Haut der Mäuse nach mindestens 24 h nach IL-22-Behandlung mit einem Maximum nach 48 h nachweisbar (Abb. 25).



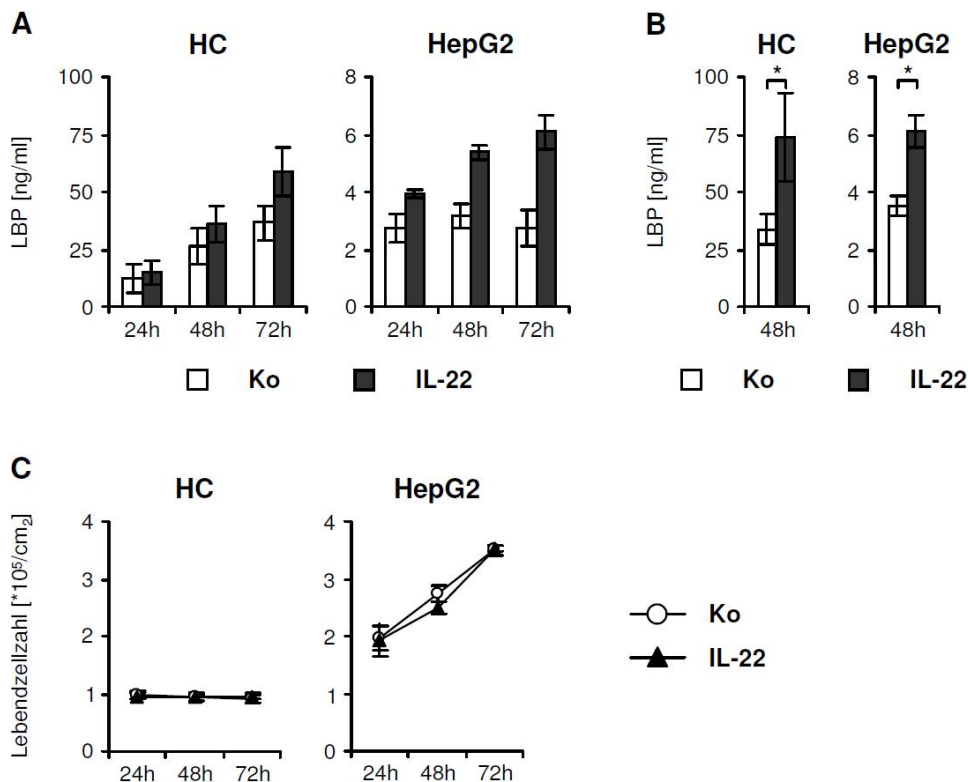
**Abb. 25: Regulation der kutanen Expression von S100A8, S100A9 und MMP1 durch IL-22 *in vivo*.** Balb/c Mäusen wurde i.p. PBS oder 1 µg rIL-22 injiziert. Direkt vor oder 1, 3, 6, 24, 48 oder 72 h nach Injektion wurde die Haut entnommen. Die Analyse der mRNA-Expression von S100A8, S100A9 und MMP1 erfolgte mittels qPCR. Dargestellt ist die Genexpression relativ zu der des Haushaltgens HPRT als Mittelwert ( $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes) von sechs (0 h) oder drei (1-72 h) Tieren pro Zeitpunkt.

Die Induktion der kutanen Expression von S100A8, S100A9 und MMP1 durch eine einmalige i.p. IL-22-Applikation bestätigt die hier *in vitro* gefundenen IL-22-Effekte auf Keratinozyten und lässt eine wichtige Rolle von IL-22 bei der Regulation von Keratinozytenfunktionen bei entzündlichen Erkrankungen, welche mit erhöhten IL-22-Spiegeln assoziiert sind, vermuten.

#### 4.3.2 Effekte von IL-22 auf Hepatozyten

Wie beschrieben sind Hepatozyten neben Keratinozyten wichtige Zielzellen von IL-22, welches in diesen Zellen die Produktion von Akut-Phase-Proteinen und einen Schutz vor Zellschädigung induziert [69, 121, 145]. Um weitere Effekte von IL-22 auf Hepatozyten zu

identifizieren, wurden zum einen primäre humane Hepatozyten, zum anderen HepG2-Zellen für jeweils 24, 48 und 72 h mit IL-22 stimuliert oder unstimuliert belassen und hinsichtlich einer möglichen Veränderung in der Konzentration sezernierter Mediatoren in den gewonnenen Zellkulturüberständen untersucht. Die Ergebnisse dieser Analyse zeigten, daß IL-22 sowohl in primären humanen Hepatozyten als auch in HepG2-Zellen eine Steigerung der Produktion des LPS-Bindungsproteins (LBP) induzierte (Abb. 26A).



**Abb. 26: Steigerung der LBP-Produktion durch IL-22 in Hepatozyten.** A, Primäre humane Hepatozyten (HC) und HepG2-Zellen wurden jeweils mit und ohne (Kontrolle) rhIL-22 für 24, 48, und 72 h stimuliert. Die Konzentration von LBP in den gewonnenen Zellkulturüberständen erfolgte mittels Immulite®. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen als Mittelwert ( $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes). B, Primäre humane Hepatozyten (HC) und HepG2-Zellen wurden jeweils mit und ohne (Kontrolle) rhIL-22 für 48 h stimuliert. Die Konzentration von LBP in den gewonnenen Zellkulturüberständen erfolgte mittels Immulite®. Dargestellt sind die Ergebnisse von fünf (HC) und sechs (HepG2) unabhängigen Versuchen als Mittelwert ( $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes). Das Signifikanzniveau der Zytokin-induzierten Steigerung der LBP-Sekretion wurde mittels des Vorzeichen-Rang-Tests für gepaarte Stichproben nach Wilcoxon ermittelt (\* $p \leq 0,05$ ). C, Primäre humane Hepatozyten (HC) und HepG2-Zellen wurden jeweils mit und ohne (Kontrolle) rhIL-22 für 24, 48, und 72 h stimuliert und anschließend die Vitalität mittels Trypanblau-Ausschluß-Kapazität und Adhärenz ermittelt. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen als Mittelwert ( $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes).

LBP ist ein überwiegend durch Leberzellen konstitutiv ins Blut abgegebenes Protein, dessen Konzentration während einer Akut-Phase-Reaktion auf das 10-Fache ansteigen kann [164]. Verschiedene Arbeiten zeigen, daß LBP konzentrationsabhängige Funktionen ausübt. Während konstitutive LBP-Level den Transport von LPS an zelluläre Rezeptoren

und damit die Aktivierung dieser Zellen fördert, scheinen hohe LBP-Konzentrationen LPS zu neutralisieren und somit dessen immunstimulatorische Aktivität zu hemmen [165].

Im zeitlichen Verlauf war ein kontinuierlicher Anstieg der LBP-Konzentration im Zellkulturüberstand der IL-22-stimulierten primären Hepatozyten und HepG2-Zellen bis 72 h nachweisbar (Abb. 26A). Interessanterweise war dabei sowohl die konstitutive als auch die IL-22-induzierte LBP-Produktion primärer Hepatozyten gegenüber der Produktion durch HepG2-Zellen etwa 10-fach stärker. Basierend auf einer größeren Anzahl von Experimenten (n=5) konnte die statistische Signifikanz der gesteigerten Produktion von LBP durch IL-22 in primären Hepatozyten und HepG2-Zellen nach 48 h Stimulationszeit nachgewiesen werden (Abb. 26B).

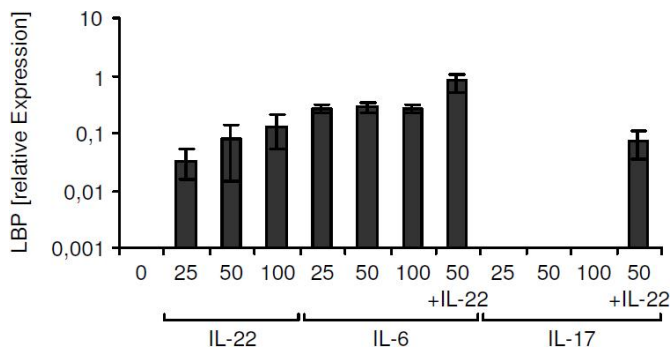
Eine zu dieser Zeit erschienene Arbeit zeigte, daß eine stabile Überexpression von IL-22 in HepG2-Zellen einer durch Serumentzug induzierten Apoptose entgegenwirkt [120]. Um auszuschließen, daß die IL-22-induzierte gesteigerte hepatozytäre LBP-Produktion nicht auf einer gesteigerten Anzahl an Hepatozyten beruht, wurde anschließend die Lebendzellzahl unstimulierter und IL-22-stimulierter primärer Hepatozyten und HepG2-Zellen im zeitlichen Verlauf bestimmt. Wie in Abb. 26C dargestellt ist, führte eine IL-22-Stimulation beider Zelltypen zu keiner Modulation der Zellzahlen und bestätigt, daß die erhöhte Konzentration von LBP im Zellkulturüberstand IL-22-stimulierter Hepatozyten tatsächlich auf einer gesteigerten LBP-Produktion beruht.

Wie erwähnt sind primäre Hepatozyten *in vitro* nur sehr bedingt proliferativ, was ihre experimentelle Nutzung limitiert (Abb. 26C). Da der IL-22-Effekt auf primäre Hepatozyten und HepG2-Zellen hinsichtlich der zeitlichen Regulation und Stärke sehr ähnlich war, wurden die weiteren Experimente zur detaillierten Analyse der Regulation der IL-22-induzierten hepatozytären LBP-Produktion mit HepG2-Zellen durchgeführt.

Als nächstes sollte untersucht werden, ob der IL-22-Effekt auf mRNA-Ebene sowie dosisabhängig reguliert ist. Gleichzeitig wurde der IL-22-Effekt mit den Effekten von IL-6 und IL-17A verglichen und mögliche Synergien untersucht. IL-6 ist eines der bedeutendsten Induktoren von LBP [166]. Von IL-17A war bekannt, daß es ähnliche Effekte wie IL-22 auf subepitheliale Myofibroblasten des Darmes und Keratinozyten hinsichtlich der Produktion von Zytokinen und antimikrobiellen Proteinen ausübt und in Synergie mit IL-22 wirkt [97, 116]. HepG2-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen (25, 50, 100 ng/ml) von IL-22, IL-6 und IL-17A, sowie einer Kombination von 50 ng/ml IL-22 mit 50 ng/ml IL-6 oder IL-17A stimuliert. Wie in Abb. 27 dargestellt ist, induzierte IL-22 eine dosisabhängige LBP-mRNA-Expression, was eine Regulation von LBP auf mRNA-Ebene durch IL-22 anzeigt. IL-6 bewirkte bereits in der niedrigsten verwendeten Konzentration (25 ng/ml) seine maximale Induktion der LBP-Expression (Abb. 27). Im Vergleich zu IL-6 war IL-22 hinsichtlich der Induktion der LBP-Expression deutlich weniger

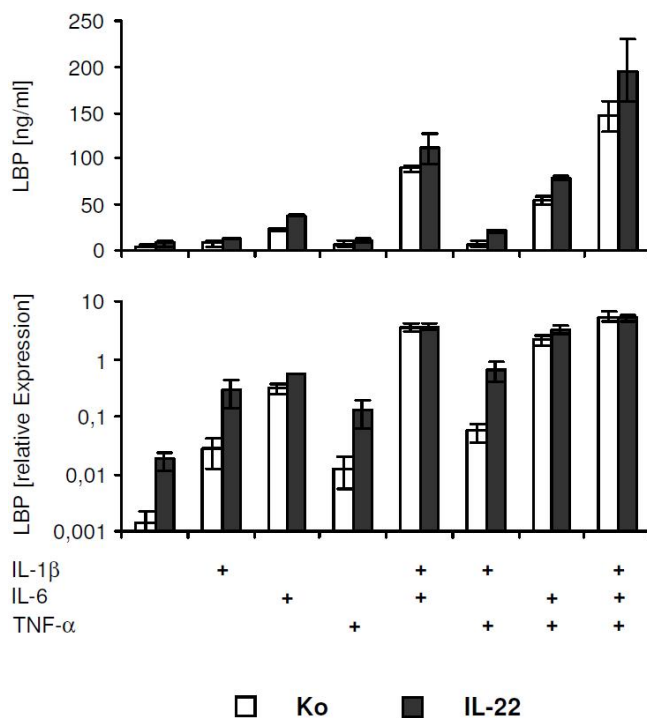


potent. Interessanterweise wirkte IL-22 jedoch klar synergistisch mit IL-6, was sich in einer deutlich gesteigerten IL-6-induzierten LBP-Expression in Anwesenheit von IL-22 zeigte (Abb. 27). Eine Stimulation von HepG2-Zellen mit IL-17A bewirkte auch in der höchsten verwendeten Konzentration (100 ng/ml) keine Induktion einer LBP-Expression und führte auch nicht zu einer Verstärkung der IL-22-Wirkung (Abb. 27).



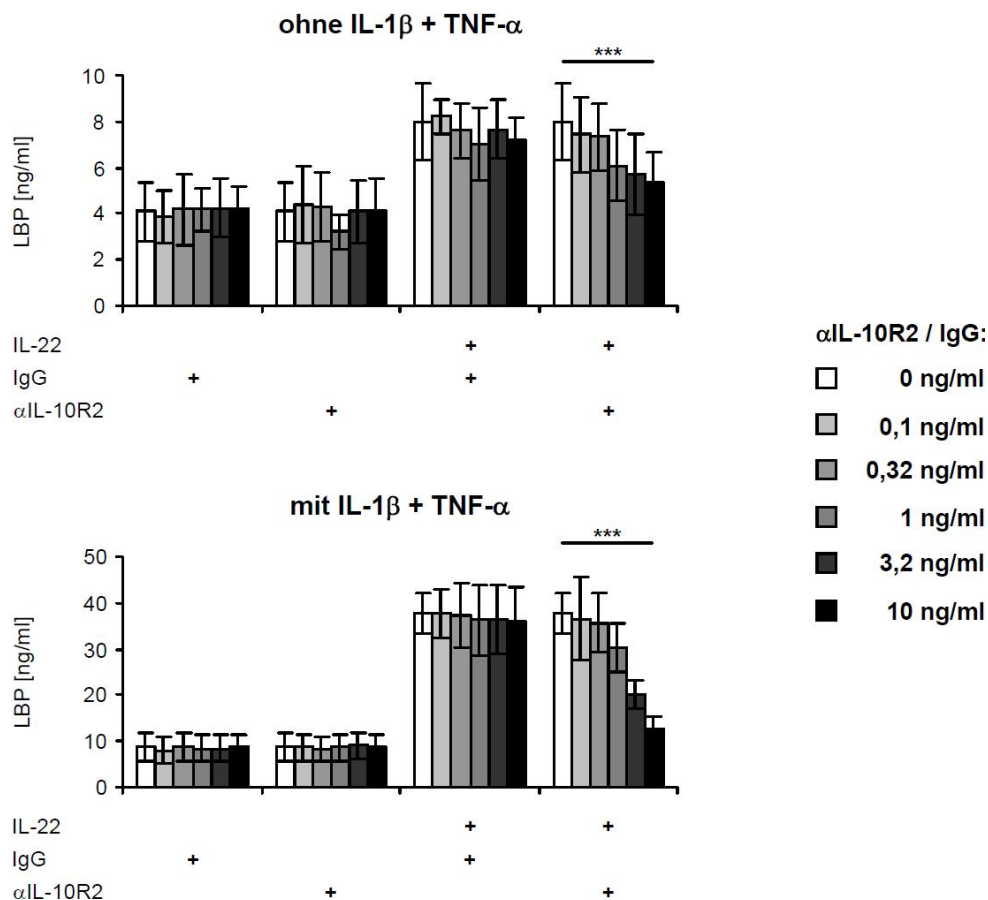
**Abb. 27: Regulation der IL-22-induzierten Steigerung der hepatozytären LBP-Produktion.** HepG2-Zellen wurden mit und ohne (Kontrolle) den dargestellten Konzentrationen von rhIL-22, rhIL-6, rhIL-17A oder Kombinationen von rhIL-6 oder rhIL-17A mit 50 ng/ml rhIL-22 für 48 h stimuliert. Die Genexpressionsanalyse erfolgte durch qPCR. Dargestellt ist die Genexpression relativ zu der des Haushaltsgens HPRT als Mittelwert ( $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes) von drei unabhängigen Versuchen.

In einem weiteren Experiment sollte der IL-22-Effekt auf die LBP-Protein- und mRNA-Expression neben IL-6 mit weiteren bekannten LBP-Induktoren, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  verglichen und eine mögliche synergistische Wirkung im Detail untersucht werden. Der Vergleich der Effekte von IL-22, IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF- $\alpha$  zeigte sowohl auf der Ebene der Proteinexpression, als auch der mRNA-Expression, daß IL-22 klar weniger potent als IL-6, jedoch etwas potenter als IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  hinsichtlich der Expression von LBP war (Abb. 28). Hierbei wirkte IL-22 synergistisch mit allen getesteten Induktoren. Die Effekte von IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  allein oder in allen möglichen Kombinationen waren in Anwesenheit von IL-22 deutlich stärker. Den größten synergistischen Effekt zeigte das Zusammenwirken von IL-22 mit IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ .



**Abb. 28: Synergistische Wirkung von IL-22 mit bekannten LBP-Induktoren.** HepG2-Zellen wurden mit und ohne (Kontrolle) rhIL-22 und in An- und Abwesenheit von rhIL-1β, IL-6, rhTNF-α oder Kombinationen dieser Zytokine für 48 h stimuliert. Oben, Die Konzentration von LBP in den gewonnenen Zellkulturüberständen erfolgte mittels Immulite®. Dargestellt sind die Ergebnisse von zwei unabhängigen Versuchen als Mittelwert (± Spannweite des Mittelwertes). Unten, Die Genexpressionsanalyse erfolgte durch qPCR. Dargestellt ist die Genexpression relativ zu der des Haushaltsgens HPRT als Mittelwert (± Spannweite des Mittelwertes) von zwei unabhängigen Versuchen.

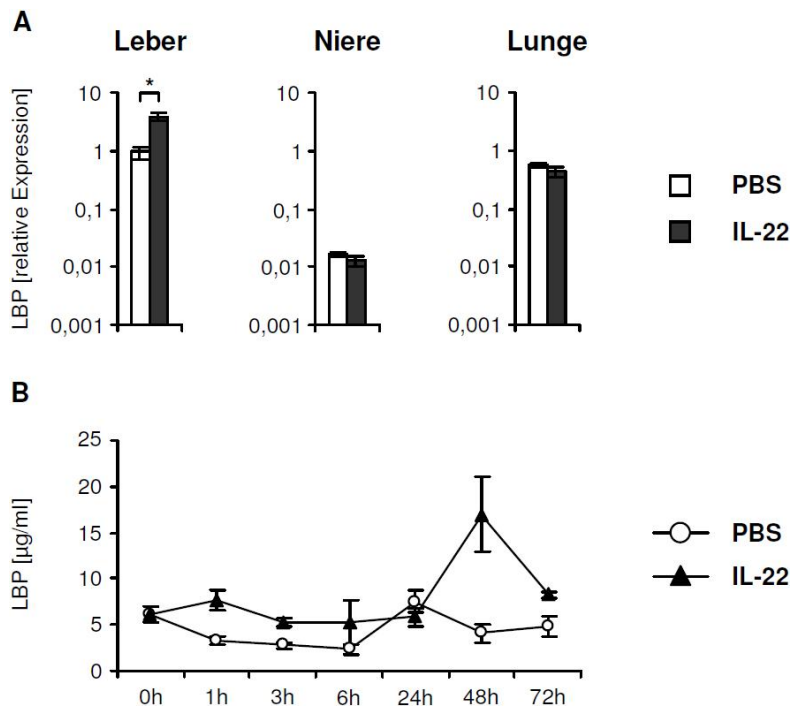
Um die Spezifität des IL-22-Effektes sicherzustellen, wurden HepG2-Zellen anschließend für 48 h mit IL-22 und mit oder ohne eine Kostimulation durch IL-1β und TNF-α in An- und Abwesenheit eines neutralisierenden Anti-IL-10R2-Ak oder eines Kontroll-Ak stimuliert. Da IL-22R1 und IL-10R2 als Bestandteil des IL-22-Rezeptors für die Signaltransduktion von IL-22 notwendig sind, sollte eine Neutralisierung der IL-10R2-Rezeptorkomponente zu einer Hemmung von IL-22-Effekten führen. Die verwendete Kostimulation durch IL-1β und TNF-α sollte eine Amplifikation des IL-22-Effektes bewirken und damit die Wirkung der Antikörperbehandlung deutlicher machen. Wie in Abb. 29 dargestellt ist, bewirkten Anti-IL-10R2-Ak, nicht jedoch Kontroll-Ak eine dosisabhängige Hemmung der IL-22-induzierten LBP-Produktion. Dieser Effekt war in mittels IL-1β und TNF-α kostimulierten HepG2-Zellen noch deutlicher und bestätigt somit klar die Spezifität des IL-22-Effektes.



**Abb. 29: Spezifität der IL-22-induzierten hepatozytären LBP-Produktion.** HepG2-Zellen wurden jeweils mit und ohne (Kontrolle) rhIL-22 in Abwesenheit (links) und Anwesenheit (rechts) von rhIL-1β und rhTNF-α für 48 h stimuliert. Diese Stimulation erfolgte in Anwesenheit steigender Konzentrationen von neutralisierenden Anti-IL-10R2-Ak (αIL-10R2) oder Kontroll-Ak (IgG). Die Konzentration von LBP in den gewonnenen Zellkulturüberständen erfolgte mittels Immulite®. Dargestellt sind die Ergebnisse von zwei (rechts) und drei (links) unabhängigen Versuchen als Mittelwert (± Spannweite des Mittelwertes) (rechts) und Mittelwert (± Standardfehler des Mittelwertes) (links). Das Signifikanzniveau der Dosis-Abhängigkeit des inhibitorischen Effektes der Anti-IL-10R2-Ak wurde mittels des L-Tests nach Page ermittelt (\*\*p < 0,01; \*\*\*p < 0,001).

Abschließend sollte die Relevanz der *in vitro* IL-22-induzierten hepatozytären LBP-Produktion *in vivo* untersucht werden. Dazu wurde weiblichen Balb/c-Mäusen eine einmalige Dosis von 1 µg IL-22 pro 20 g Körpergewicht oder ein entsprechendes Volumen PBS i.p. appliziert, nach 48 h Leber, Niere und Lunge entnommen und anschließend deren LBP-mRNA-Expression analysiert. Die Untersuchung von Niere und Lunge begründete sich auf Ergebnisse einer Arbeit welche zeigt, daß neben der hepatozytären LBP-Expression LBP auch in der Niere und der Lunge exprimiert wird [167]. Zusätzlich wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Applikation Blut für die Gewinnung von Plasma entnommen. Wie erwartet, zeigten die IL-22-behandelten Mäuse eine signifikant erhöhte hepatische IL-22-Expression gegenüber den PBS-behandelten Tieren (Abb. 30A). Die

renale und pulmonale LBP-Expression war hingegen gegenüber einer PBS-Applikation nicht durch die IL-22-Applikation verändert (Abb. 30A). Die durch IL-22-induzierte erhöhte LBP-Expression in der Leber war von deutlich erhöhten (4-fach) systemischen LBP-Spiegeln im Blut der IL-22-behandelten Tiere nach 48 h gegenüber der PBS-Applikation begleitet (Abb. 30B). Nachfolgend fielen die LBP-Plasmaspiegel der IL-22-behandelten Mäuse wieder auf die Höhe der Spiegel der PBS-behandelten Mäuse ab.



**Abb. 30: Steigerung der hepatozytären Expression und der systemischen Spiegel von LBP durch IL-22 *in vivo*.** Balb/c Mäusen wurde i.p. PBS oder 1  $\mu\text{g}$  rmlIL-22 injiziert und 48 h nach Injektion Leber, Niere und Lunge entnommen. Direkt vor und 1, 3, 6, 24, 48 und 72 h nach Injektion wurde Blut entnommen und Plasma gewonnen. A, Die Genexpressionsanalyse erfolgte mittels qPCR. Dargestellt ist die Genexpression relativ zu der des Haushaltsgens HPRT als Mittelwert ( $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes) von vier (PBS) oder drei (IL-22) Tieren pro Gruppe. Das Signifikanzniveau der Unterschiede zwischen beiden Gruppen wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt (\* $p < 0,05$ ). B, Die Konzentration von LBP im Blutplasma erfolgte mittels ELISA. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei Tieren pro Gruppe, oder von sechs (0 h) und zwei (6 h IL-22) Tieren pro Gruppe als Mittelwert ( $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes) oder als Mittelwert ( $\pm$  Spannweite des Mittelwertes) (6 h IL-22).

Die Ergebnisse der Untersuchung möglicher IL-22-Effekte auf Hepatozyten zeigte somit, daß IL-22 in Hepatozyten LBP induziert, welches zur Begrenzung der inflammatorischen Wirkung mikrobieller Bestandteile wie LPS beitragen könnte.

### 4.3.3 Effekte von IL-22 und chronisch-entzündliche Erkrankungen

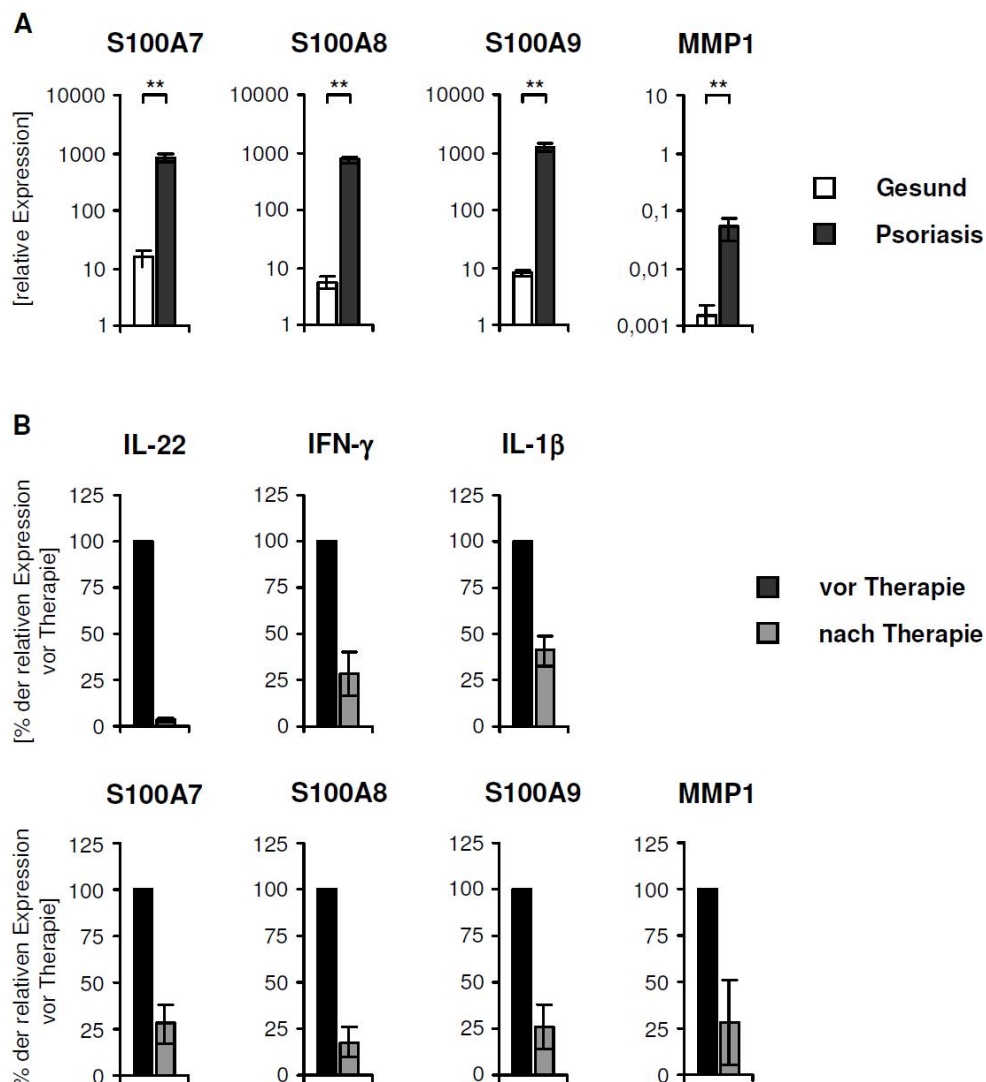
#### 4.3.3.1 Effekte von IL-22 und Psoriasis

Die breite Analyse möglicher IL-22-Effekte auf Keratinozyten zeigte, daß IL-22 in diesen Zellen durch die Regulation der Expression von antimikrobiellen Proteinen, differenzierungsregulierenden und mobilitätsassoziierten Proteinen eine potentielle Steigerung der antimikrobiellen Abwehr und Migrationsfähigkeit, sowie eine Hemmung der terminalen Differenzierung und damit einer normalen Hornzellbildung bewirkt (Abb. 16). Interessanterweise sind diese Keratinozytenfunktionen in gleicher Weise in der Haut von Patienten mit Psoriasis verändert [156]. Um zu untersuchen, ob die Expression ausgewählter Gene, welche durch IL-22 in Keratinozyten hinsichtlich einer gesteigerten antimikrobiellen Abwehr und gesteigerten Migrationsfähigkeit reguliert waren, auch bei der Psoriasis nachweisbar verändert ist, wurden Stanzbiopsien aus der läsionalen Haut von Psoriasis-Patienten und aus der Haut gesunder Kontrollprobanden entnommen und deren Expression von S100A7, S100A8, S100A9 und MMP1 analysiert. Tatsächlich war die Expression aller hier untersuchten Gene in der läsionalen psoriatischen Haut gegenüber der Haut von gesunden Kontrollprobanden signifikant ( $p < 0,01$ ) erhöht (Abb. 31A).

Die bereits durch unsere Gruppe gezeigte massive kutane IL-22-Expression [109] sowie die hohen systemischen IL-22-Spiegel bei der Psoriasis (Abb. 3) lassen vermuten, daß IL-22 direkt zur Entstehung psoriatischer Hautveränderungen und der dabei durch die gesteigerte antimikrobielle Abwehr bedingten limitierten Zahl von Hautinfektionen beiträgt und somit eine wichtige Rolle bei der Pathogenese dieser Erkrankung spielt. Um die Signifikanz der Rolle von IL-22 bei der Entstehung der gesteigerten antimikrobiellen Abwehr und der psoriatischen Hautveränderungen zu untersuchen, wurde als nächstes eine mögliche Korrelation der kutanen Expression von IL-22 mit der kutanen Expression von S100A7, S100A8, S100A9 und MMP1 untersucht. Die Korrelationsanalyse ergab eine positive Korrelation zwischen der kutanen Expression von IL-22 und S100A7 (Spearman's Korrelationskoeffizient = 0,80;  $p < 0,001$ ), von IL-22 und S100A8 (Spearman's Korrelationskoeffizient = 0,79;  $p < 0,001$ ), von IL-22 und S100A9 (Spearman's Korrelationskoeffizient = 0,78;  $p < 0,001$ ) und von IL-22 und MMP1 (Spearman's Korrelationskoeffizient = 0,66;  $p < 0,001$ ).

Weiter wurde untersucht werden, ob eine Psoriasis-Therapie, die zu einer deutlichen Verbesserung des Hautbildes führt, die kutane IL-22-Expression beeinflusst. Eine auf UV-Bestrahlung basierende anti-psoriatische Therapie bewirkte eine starke Verminderung der IL-22-Expression in der läsionalen Haut sowie eine Verminderung der kutanen Expression von IFN- $\gamma$  und IL-1 $\beta$  (Abb. 31B), wobei die Verminderung der IL-22-Expression 96,6% und der Expression von IFN- $\gamma$  und IL-1 $\beta$  72,1% bzw. 59,2% betrug. Im Einklang mit den

Ergebnissen der Korrelationsanalyse war die Expression der durch IL-22 in Keratinozyten regulierten Proteine S100A7, S100A8, S100A9 und MMP1 nach erfolgreicher antipsoriatischer Therapie ebenfalls stark vermindert (Abb. 31B).

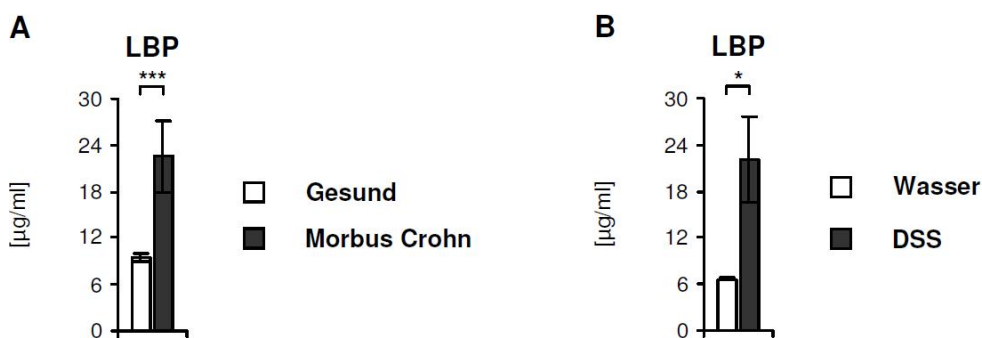


**Abb. 31: Kutane Expression von IL-22 und von durch IL-22-regulierten Genen bei Psoriasis.** A, Aus der läsionalen Haut von Psoriasis-Patienten und Haut gesunder Kontrollprobanden wurden Stanzbiopsien entnommen und deren RNA isoliert. Die Genexpressionsanalyse von S100A7, S100A8, S100A9 und MMP1 erfolgte durch qPCR. Dargestellt ist die Genexpression relativ zu der des Haushaltsgens HPRT als Mittelwert ( $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes) von sechs Spendern pro Gruppe. Das Signifikanzniveau der Unterschiede zwischen beiden Gruppen wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt (\*\* $p < 0,01$ ). B, Aus der läsionalen Haut von Psoriasis-Patienten wurden vor und nach einer anti-psoriatischen Therapie Stanzbiopsien entnommen und deren RNA isoliert. Die Analyse der mRNA-Expression von IL-22, IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , S100A7, S100A8, S100A9 und MMP1 erfolgte durch qPCR. Dargestellt ist die Genexpression relativ zu der des Haushaltsgens HPRT als % der relativen Expression vor Therapie (Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes) von drei Spendern pro Gruppe.

Diese Ergebnisse zusammen mit der in Abb. 3 dargestellten positiven Korrelation der IL-22-Plasma-Konzentration mit dem Schweregrad der Erkrankung lassen vermuten, daß IL-22 eine wichtige Rolle bei der Pathogenese der Psoriasis spielt.

#### 4.3.3.2 Effekte von IL-22 und Morbus Crohn

Als zweite hier untersuchte chronisch-entzündliche Erkrankung ist auch Morbus Crohn durch eine lokal erhöhte IL-22-Expression im Kolon und möglicherweise in den drainierenden Lymphknoten wie aus dem murinen Modell der DSS-induzierten Kolitis ableitbar ist [116, 117] sowie durch stark erhöhte systemische IL-22-Spiegel im Blut, welche mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelieren, gekennzeichnet (Abb. 5A, B). Wie in Kapitel 4.3.2 beschrieben, führt die systemische Gabe von IL-22 zu einer erhöhten Expression von LBP in der Leber und zu erhöhten LBP-Spiegeln im Blut (Abb. 30). Diese Ergebnisse ließen vermuten, daß die bei Morbus Crohn ebenfalls stark erhöhten IL-22-Plasma-Spiegel möglicherweise zu einer gesteigerten LBP-Produktion in der Leber und zu einer erhöhten LBP-Plasmakonzentration führen und damit einen protektiven antiinflammatorischen Effekt haben. Aus dem Blut sowohl von Morbus-Crohn-Patienten und gesunden Kontrollprobanden, als auch von Mäusen mit und ohne DSS-induzierte experimentelle Kolitis wurde Plasma gewonnen und deren LBP-Konzentration bestimmt.



**Abb. 32: Systemische Spiegel von LBP bei Morbus Crohn und experimenteller Kolitis.** A, Die Konzentration von LBP im Blutplasma wurde mittels Immulite<sup>®</sup> bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse von zehn Spendern pro Gruppe als Mittelwerte ( $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes). Das Signifikanzniveau der Unterschiede zwischen beiden Gruppen wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt ( $***p < 0,001$ ). B, Durch Zusatz von DSS im Trinkwasser über einen Zeitraum von 5 d wurde in BALB/c Mäusen eine akute Kolitis induziert. Kontroll-Mäuse erhielten Trinkwasser ohne DSS. Anschließend wurde Blut entnommen und Plasma gewonnen. Die Konzentration von LBP im Blutplasma wurde mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Ergebnisse von drei (Wasser) oder vier (DSS) Tieren pro Gruppe als Mittelwerte ( $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes). Das Signifikanzniveau der Unterschiede zwischen den Gruppen wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt ( $*p < 0,05$ ).

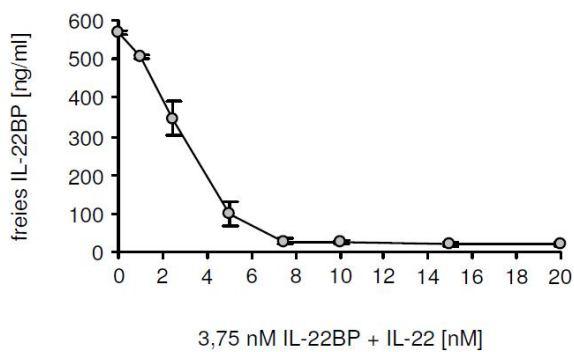
Tatsächlich wiesen Morbus-Crohn-Patienten eine signifikant erhöhte LBP-Plasmakonzentration ( $p < 0,001$ ) im Vergleich zu gesunden Kontrollprobanden (Abb. 32A) auf. Auch im Mausmodell der experimentellen DSS-induzierten Kolitis waren die systemischen LBP-Spiegel DSS-behandelter Mäuse im Vergleich zu den Wasser-behandelten Tiere signifikant ( $p < 0,05$ ) erhöht (Abb. 32B).

#### 4.4 Biologische Rolle von IL-22BP

##### 4.4.1 Affinität von IL-22BP zu IL-22

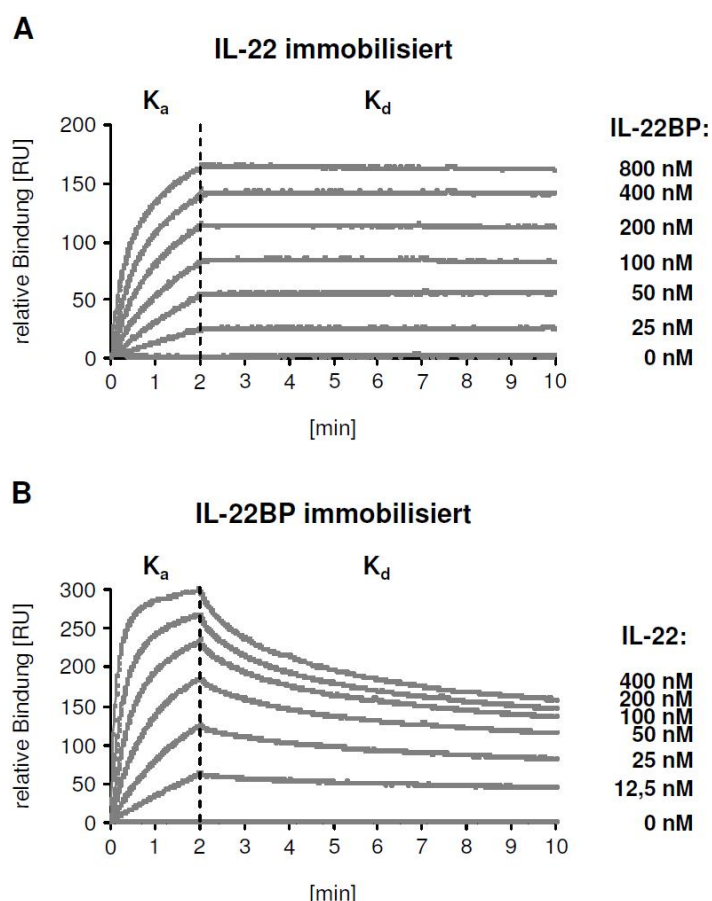
Neben dem zelloberflächenständigen IL-22-Rezeptor, welcher aus den Rezeptorketten IL-22R1 und IL-10R2 besteht, stellt IL-22BP eine weitere, jedoch sezernierte („lösliche“) und somit signaltransduktionsinkompetente monomere IL-22-bindende Rezeptorkette dar, die sich durch das Fehlen einer transmembranären und zytoplasmatischen Domäne auszeichnet. Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, daß IL-22BP *in vitro* in hohen Konzentrationen zu einer Hemmung der Signaltransduktion von IL-22 und damit zu einer Hemmung von IL-22-Effekten führt [112, 148, 150, 152, 168]. Neben der negativ regulatorischen Rolle auf die Zytokinwirkung durch Hemmung der Interaktion zwischen Zytokin und dem zelloberflächenständigen Rezeptor ist auch systemisch eine positive regulatorische Rolle löslicher Rezeptoren beispielweise durch einen Schutz des Zytokins vor proteolytischem Abbau und einer damit verbundenen Verlängerung der Halbwertszeit möglich. Neben der Konzentration des Zytokins ist für die Art der Regulation die Affinität beider Bindungspartner entscheidend. Um die Rolle von IL-22BP bei der Regulation der IL-22-Aktivität näher zu beleuchten, wurde die Affinität von IL-22 und IL-22BP mittels SPR in zwei unterschiedlichen Ansätzen untersucht. Hierfür wurde ein kommerziell erhältliches Fc-gekoppeltes Dimer des IL-22BP (IL-22BP<sub>2</sub>-Fc) genutzt. Für die Analyse der Affinität im Gleichgewicht wurde eine feststehende Konzentration von IL-22BP<sub>2</sub>-Fc (3,75 nM) mit steigenden Konzentrationen von IL-22 für 2 h vorinkubiert. Die Bestimmung der Affinität erfolgte basierend auf der Messung der Konzentration von freiem IL-22BP<sub>2</sub>-Fc im Gleichgewichtszustand durch Bindung an einen mit IL-22-immobilisierten Sensorchip und nachfolgender Analyse mittels des „Solution Affinity“ Bindungsmodells (Abb. 33). Die Analyse der Affinität von IL-22BP<sub>2</sub>-Fc zu IL-22 im Gleichgewicht ergab eine hohe Affinität mit einer Dissoziationskonstante  $K_D$  von weniger als 3 nM (Tab. 3). Aufgrund der begrenzten Sensitivität konnte jedoch der exakte Wert mit dieser Methode nicht ermittelt werden.





**Abb. 33: Interaktion von IL-22 und IL-22BP im Gleichgewicht.** Die Interaktion zwischen IL-22 und IL-22BP im Gleichgewicht wurde mittels SPR analysiert. rhIL-22 wurde in steigenden Konzentrationen (0 / 1 / 2,5 / 5 / 7,5 / 10 / 20 nM) für 2 h mit 3,75 nM rhIL-22BP2-Fc inkubiert. Die Kalkulation der Konzentration von freiem rhIL-22BP2-Fc erfolgte durch Messung der Bindung an einen mit rhIL-22 immobilisierten Sensorchip mittels einer Kalibrierungskurve verschiedener IL-22BP-Konzentrationen. Dargestellt sind die Ergebnisse von zwei unabhängigen Versuchen als Mittelwerte ( $\pm$  Spannweite des Mittelwertes).

Anschließend sollte die Kinetik der Interaktion von IL-22 und IL-22BP untersucht werden. Zum Einen wurde hier IL-22BP<sub>2</sub>-Fc über einen mit IL-22 immobilisierten Sensorchip (Abb. 34A) geleitet, zum Anderen wurde die Bindung von IL-22 an einen mit IL-22BP<sub>2</sub>-Fc immobilisierten Sensorchip (Abb. 34B) untersucht. Durch Anpassen der Bindungskurven an Bindungsmodelle wurden die Assoziationsrate ( $K_a$ ) und die Dissoziationsrate ( $K_d$ ) ermittelt (Tab. 3). Die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) ergibt sich hierbei aus dem Quotienten von  $K_d$  und  $K_a$ . Im Einklang mit den Ergebnissen der Analyse im Gleichgewichtszustand ergab sich für beide Varianten der Untersuchung zur Bestimmung der Bindungskinetik eine Dissoziationskonstante  $K_D$  von  $\sim 1$  nM (Tab. 3). Die Affinität von IL-22 und IL-22BP ist daher 4 bis 10 mal höher als die von Walter *et al.* beschriebene Affinität von IL-22 zu seinem zelloberflächenständigen Rezeptor IL-22R1 [24]. Die stärkere Affinität von IL-22 zu IL-22BP war hier vor allem durch die geringere Dissoziationsrate von weniger als  $2 \cdot 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  im Vergleich zu  $40 \cdot 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  für die Interaktion von IL-22 mit IL-22R1 begründet (Tab. 3, [24]). Die Kinetik der Interaktion von IL-22BP mit immobilisiertem IL-22 war von einer relativ geringen Assoziationsrate von  $5,2 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$  und einer minimalen Dissoziationsrate von  $7 \cdot 10^{-5} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  gekennzeichnet (Tab. 3). Diese Ergebnisse sowie die in Abb. 34A dargestellte Bindungskurve zeigen, daß gebildete IL-22BP-IL-22-Komplexe sehr stabil sind. Die Untersuchung der Bindungskinetik von IL-22 an immobilisiertes IL-22BP ergab im Unterschied dazu eine etwas stärkere Assoziation ( $K_a = 2,9 \cdot 10^5 \text{ s}^{-1}$ ) und eine starke Dissoziation ( $K_d = 2 \cdot 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) (Tab. 3). Die leicht unterschiedlichen Assoziations- und Dissoziationsraten beider experimenteller Ansätze beruhen dabei wahrscheinlich auf der dimeren Fc-gekoppelten Struktur des hier verwendeten IL-22BP<sub>2</sub>-Fc, dessen Bindungseigenschaften möglicherweise davon abhängen, ob es in immobilisierter oder freier Form vorliegt.



**Abb. 34: Kinetik der Interaktion von IL-22 und IL-22BP.** Die Kinetik der Interaktion zwischen IL-22 und IL-22BP wurde mittels SPR analysiert. rhIL-22BP2-Fc (A) und rhIL-22 (B) wurden für 2 min in steigenden Konzentrationen über einen mit rhIL-22 immobilisierten (A) oder mit rhIL-22BP2-Fc immobilisierten (B) Sensorchip geleitet und die relative Bindung während der Assoziation (2 min) und der Dissoziation (8 min) als Veränderung der relativen Resonanzeinheiten (RU) gemessen. Dargestellt sind die Ergebnisse eines von vier (oben) und drei (unten) unabhängigen Versuchen.

**Tab. 3: Affinität von IL-22BP zu IL-22.** Die Bestimmung von Assoziationsrate ( $K_a$ ), Dissoziationsrate ( $K_d$ ) und Dissoziationskonstante (Affinität,  $K_D$ ) der Kinetik der Interaktion von IL-22 und IL-22BP erfolgte durch Anpassen der Bindungsmodelle „Bivalenter Analyt“ (IL-22 immobilisiert) und „Heterogener Ligand“ (IL-22BP immobilisiert). Die Bestimmung der Dissoziationskonstante (Affinität,  $K_D$ ) im Gleichgewichtszustand erfolgte mittels „Solution Affinity“ aus der kalkulierten Konzentration von freiem IL-22BP nach zweistündiger Inkubation von 3,75 nM IL-22BP mit verschiedenen Konzentrationen von IL-22. Dargestellt sind die Ergebnisse von vier (Kinetik, IL-22 immobilisiert), drei (Kinetik, IL-22BP immobilisiert) und fünf (Solution Affinity) unabhängigen Versuchen als Mittelwerte ( $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes).

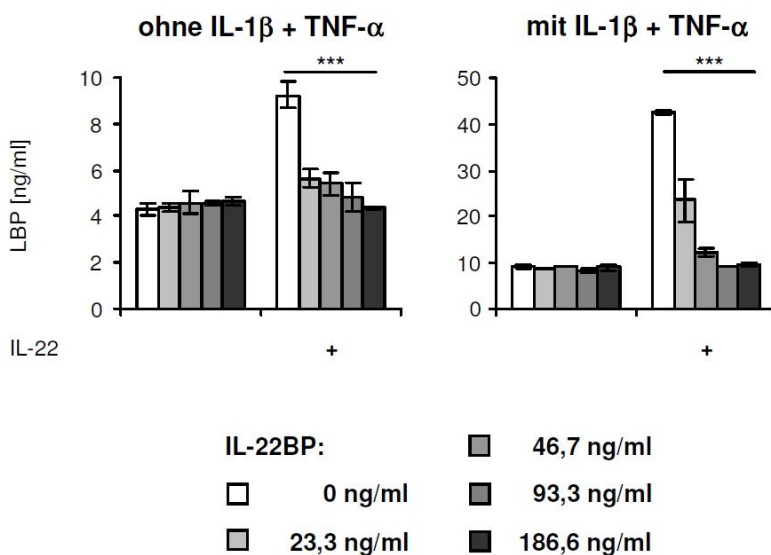
Protein immobilisiert	lösliche Phase	$K_a$ [ $s^{-1}$ ]	$K_d$ [ $M^{-1}s^{-1}$ ]	$K_D$ [nM]
IL-22	IL-22BP	$5,2 \pm 0,2 \times 10^4$	$7,0 \pm 0,3 \times 10^{-5}$	$1,4 \pm 0,6$
IL-22BP	IL-22	$2,9 \pm 0,1 \times 10^5$	$2,0 \pm 0,2 \times 10^{-4}$	$0,7 \pm 0,1$
IL-22	IL-22, IL-22BP*	-	-	< 3 nM

\* Messung des freien IL-22BP

Die Ergebnisse der Analyse der Affinität und der Kinetik der Interaktion von IL-22 und IL-22BP zeigen, daß die Bindung von IL-22 und IL-22BP sehr stabil ist und von einer geringen Zerfallsrate gekennzeichnet ist. Dies läßt vermuten, daß IL-22BP vornehmlich eine negative Rolle bei der Regulation der IL-22-Aktivität spielt.

#### 4.4.2 Regulation der IL-22-Aktivität durch IL-22BP *in vitro*

Die Ergebnisse der Affinitätsanalyse zeigten, daß IL-22BP IL-22 mit einer stärkeren Affinität bindet als die zelloberflächenständige Rezeptorkette IL-22R1 und daß IL-22BP–IL-22 Komplexe sehr stabil sind. Als nächstes sollte die daraus vermutete negative Rolle von IL-22BP bei der Regulation der IL-22-Aktivität *in vitro* validiert werden. Dazu wurde der Einfluß einer zweistündigen Vorinkubation von IL-22 mit IL-22BP, in einem molaren Verhältnis von 1:0,5 / 1:1 / 1:2 / 1:4 vor Stimulationsbeginn auf die IL-22-induzierte Produktion von LBP durch HepG2-Zellen untersucht. Die zusätzliche Kostimulation mittels IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  sollte auch hier durch eine Steigerung des IL-22-Effektes eine mögliche Wirkung von IL-22BP deutlicher machen.

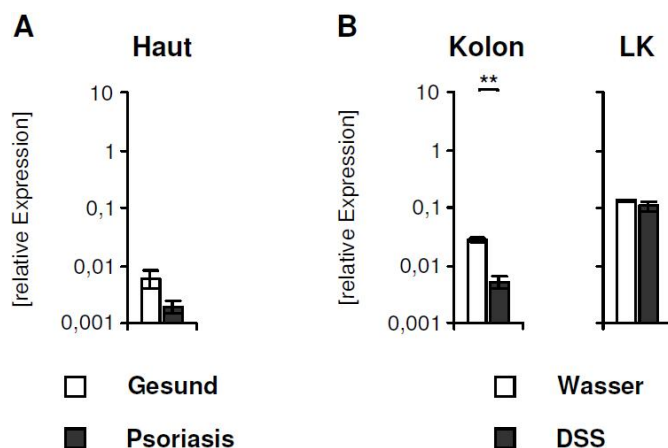


**Abb. 35: Einfluß von IL-22BP auf die IL-22-induzierte Steigerung der LBP-Produktion in Hepatozyten.** HepG2-Zellen wurden jeweils in Abwesenheit (links) und Anwesenheit (rechts) von rhIL-1 $\beta$  und rhTNF- $\alpha$  mit und ohne (Kontrolle) rhIL-22, nach einer zweistündigen Vorinkubation mit steigenden Konzentrationen von rhIL-22BP2-Fc, für 48 h stimuliert. Die Konzentration von LBP in den gewonnenen Zellkulturüberständen erfolgte mittels Immulite<sup>®</sup>. Dargestellt sind die Ergebnisse von zwei unabhängigen Versuchen als Mittelwert ( $\pm$  Spannweite des Mittelwertes). Das Signifikanzniveau der Dosis-Abhängigkeit des inhibitorischen Effektes von rhIL-22BP2-Fc wurde mittels des L Tests nach Page ermittelt (\*\*\*)  $p < 0,001$ .

Tatsächlich bewirkte die Anwesenheit von IL-22BP eine starke, dosisabhängige ( $p < 0,001$ ) Verminderung der IL-22-induzierten LBP-Produktion (Abb. 35). Dieser Effekt von IL-22BP war hier bereits ohne Kostimulation klar nachweisbar (Abb. 35). Bereits in einem molaren Verhältnis IL-22:IL-22BP von 1:0,5 war der IL-22-Effekt um 39% (ohne Kostimulation) und 44% (mit Kostimulation) vermindert. Eine fast vollständige Hemmung der LBP-Produktion durch IL-22 wurde durch das Vorhandensein gleicher molarer Mengen von IL-22 und IL-22BP erreicht. Dieses Ergebnis unterstreicht die starke Affinität von IL-22BP zu IL-22 und bekräftigt die vermutete Rolle von IL-22BP als negativer Regulator der IL-22-Aktivität.

#### 4.4.3 mRNA-Expression von IL-22BP in chronisch-entzündlichen Erkrankungen

Um die vermutete Rolle von IL-22BP als negativen Regulator der IL-22-Aktivität *in vivo* näher zu beleuchten, sollte abschließend die Expression von IL-22BP bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen untersucht werden. Wie bereits erwähnt, war durch frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe bekannt, daß IL-22 massiv in der läsionalen Haut von Psoriasis-Patienten, nicht jedoch in der Haut gesunder Kontroll-Probanden exprimiert ist [109]. Wie in Kapitel 4.1 erwähnt, zeigte die Analyse der Lokalisation der IL-22-Expression bei der DSS-induzierten experimentellen Kolitis, daß IL-22 massiv im Kolon und weniger stark auch in den mesenterialen Lymphknoten der DSS-behandelten Tiere, jedoch nicht im Kolon oder Lymphknoten der Wasser-behandelten Tiere exprimiert war (Abb. 6A, B). Die Möglichkeit einer Interaktion zwischen IL-22 und IL-22BP setzt eine temporäre und lokale Nähe beider Bindungspartner zueinander voraus. Daher wurde im Weiteren untersucht, ob bei der Psoriasis oder der DSS-induzierten experimentellen Kolitis neben IL-22 gleichzeitig auch der Inhibitor IL-22BP in seiner Konzentration reguliert ist. Dazu wurde die Expression von IL-22BP in Stanzbiopsien aus der läsionalen Haut von Psoriasis-Patienten und aus der Haut gesunder Kontrollprobanden sowie im Kolon und in den mesenterialen Lymphknoten von Mäusen nach einer fünftägigen Gabe von 2,5% DSS-haltigem oder DSS-freiem Trinkwasser analysiert. Wie in Abb. 36A dargestellt ist, war IL-22BP in der läsionalen psoriatischen Haut gegenüber der Haut gesunder Kontrollprobanden vermindert exprimiert. Eine lokale Verminderung der IL-22BP-Expression war auch im murinen Kolitis-Modell nachweisbar. Hier war die Expression von IL-22BP im Kolon, nicht jedoch in den Lymphknoten der DSS-behandelten Tiere im Vergleich zu den mit Wasser behandelten Mäusen signifikant ( $p < 0,01$ ) vermindert (Abb. 36B).



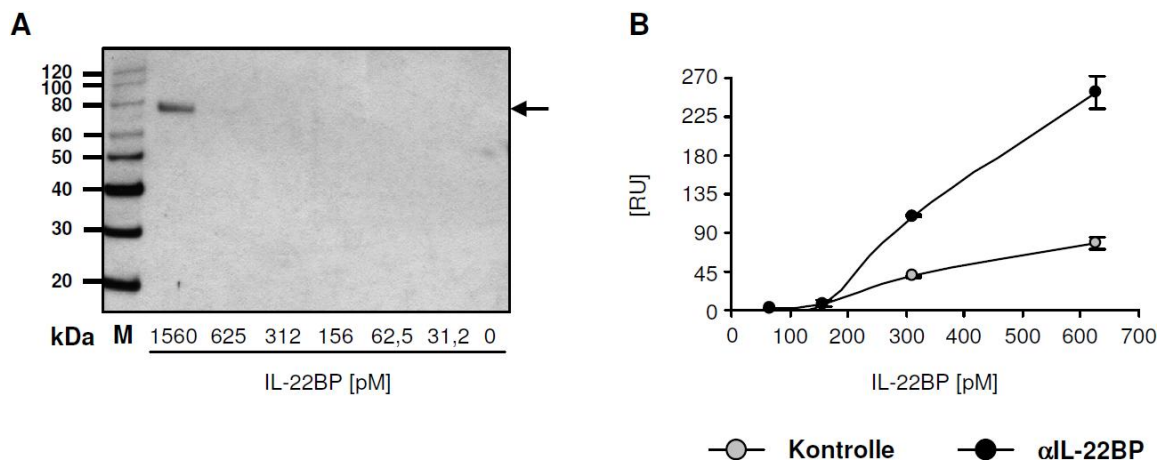
**Abb. 36: Expression von IL-22BP in chronisch-entzündlichen Erkrankungen.** A, Aus der läsionalen Haut von Psoriasis-Patienten und Haut gesunder Kontrollprobanden wurden Stanzbiopsien entnommen und deren RNA isoliert. Die Genexpressionsanalyse von IL-22BP erfolgte durch qPCR. Dargestellt ist die Genexpression relativ zu der des Haushaltsgens HPRT als Mittelwert ( $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes) von vier (Gesund) oder elf (Psoriasis) Spendern pro Gruppe. B, Durch Zusatz von DSS im Trinkwasser über einen Zeitraum von 5 d wurde in BALB/c Mäusen eine akute Kolitis induziert. Kontroll-Mäuse erhielten Trinkwasser ohne DSS. Die Analyse der mRNA-Expression von IL-22BP in Kolon (links) und mesenterialen Lymphknoten (LK, rechts) erfolgte durch qPCR. Dargestellt ist die Genexpression relativ zu der des Haushaltsgens HPRT als Mittelwert ( $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes) von sechs Tieren pro Gruppe. Das Signifikanzniveau der Unterschiede zwischen beiden Gruppen wurde mittels des Mann-Whitney-U-Tests ermittelt ( $**p < 0,01$ ).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß IL-22BP als negativer Regulator der IL-22-Aktivität unter inflammatorischen Bedingungen, welche mit einer verstärkten Produktion von IL-22 assoziiert sind, lokal im entzündeten Gewebe vermindert produziert wird. Die resultierende stark erhöhte Ratio von IL-22/IL-22BP könnte unter diesen Bedingungen lokale Effekte von IL-22 unterstützen.

#### 4.4.4 Quantitativer Proteinnachweis von IL-22BP

Neben der lokalen mRNA-Konzentration wäre eine Bestimmung der Proteinkonzentration von IL-22BP in Körperflüssigkeiten wichtig, da systemisch vorhandenes IL-22BP eine Regulation der Wirksamkeit des systemisch vorhandenen IL-22 bewirken könnte. Daher sollte in dieser Arbeit ein quantitativer Proteinnachweis von IL-22BP etabliert werden. Als erstes wurde die Möglichkeit des Nachweises von IL-22BP mit einem kommerziell erhältlichen, polyklonalen Anti-IL-22BP-Aks mittels Westernblot und die Sensitivität und Spezifität dieses Aks gegenüber verschiedenen Konzentrationen (31,2 / 62,5 / 156 / 312 / 625 und 1560 pM) von IL-22BP untersucht. Das hierfür verwendete IL-22BP<sub>2</sub>-Fc hat ein Molekulargewicht von 160 kDa. Die Ergebnisse zeigen, daß nur die höchste hier verwendete IL-22BP<sub>2</sub>-Fc-Konzentration (1560 pM) eine klare spezifische Bande der monomeren, chemisch reduzierten Form (80 kDa) ergab, während die nächst geringeren

hier verwendeten Konzentrationen kein klares Signal zeigten (Abb. 37A). Daraus lässt sich eine minimale Nachweisgrenze von IL-22BP mittels Westernblot von 1560 pM ableiten. Dies entspricht einer Konzentration von 250 ng/ml.



**Abb. 37: Testung der Quantifizierbarkeit der Proteinkonzentration von IL-22BP.** A, Der Nachweis verschiedener Konzentrationen von rhIL-22BP<sub>2</sub>-Fc (0 / 31,2 / 62,5 / 156 / 312 / 625 / 1560 pM) erfolgte mittels Westernblot-Analyse. Dargestellt ist das Ergebnis eines Versuches. B, Die Bestimmung des Bindungssignals als relative Resonanzeinheiten (RU) verschiedener Konzentrationen von rhIL-22BP<sub>2</sub>-Fc (62,5 / 156 / 312 / 625 pM) an einen mit rhIL-22 immobilisierten Sensorchip und mit oder ohne (Kontrolle) nachfolgendem Fluß von 20 µg/ml Anti-IL-22BP-pAk ( $\alpha$ IL-22BP) erfolgte mittels SPR. Dargestellt sind die Ergebnisse der Doppelbestimmung eines Versuches als Mittelwerte ( $\pm$  Spannweite des Mittelwertes).

Als zweites wurde untersucht, ob die Quantifizierung von IL-22BP mittels SPR-Technologie eine gegenüber dem Westernblot sensitivere Methode darstellt. Hier erfolgte die Detektion von IL-22BP über die Bindung an einen mit IL-22 immobilisierten Sensorchip. Dazu wurden steigende Konzentrationen von IL-22BP<sub>2</sub>-Fc (62,5 / 156 / 312 / 625 pM) über die Oberfläche des Sensorchips bei einer sehr geringen Fließgeschwindigkeit von 10 µl/min geleitet und die relative Bindung als Veränderung des SPR-Signals als Resonanzeinheiten (RU) gemessen. Die resultierenden Bindungssignale ergaben eine minimale Sensitivität von 156 pM IL-22BP (7,9 RU) (Abb. 37B). Dies entspricht einer Konzentration von 25 ng/ml. Da die Veränderung des SPR-Signals auf der Sensorchipoberfläche und damit des IL-22BP-Bindungssignals proportional zu der an die Oberfläche aufgelagerte Proteinmenge ist, kann durch eine der Bindung des löslichen Proteins (IL-22BP) nachfolgende Anwendung eines zweiten Bindungspartners das SPR-Signal deutlich verstärkt werden. Daher wurde in einem weiteren Versuch unter identischen Bedingungen zusätzlich der Einfluß des polyklonalen Anti-IL-22BP-Aks für eine mögliche Verstärkung des Bindungssignals von IL-22BP getestet. Die Verwendung des Anti-IL-22BP-Aks bewirkte hier zwar eine Verstärkung des SPR-Signals hoher

IL-22BP-Konzentrationen (625 und 312 pM), hatte jedoch keinen Einfluß auf die Stärke des SPR-Signals niedriger IL-22BP-Konzentrationen (156 und 62,5 pM) und führte damit zu keiner Verringerung der minimalen Nachweisgrenze von 25 ng/ml IL-22BP mit dieser Methode (Abb. 37B).

Die Ergebnisse zeigen, daß der Proteinnachweis von IL-22BP mittels SPR eine 10-fach sensitivere Methode als der Nachweis mittels Westernblot mit dem hier verwendeten Ak darstellt. Bei Annahme ähnlicher systemischer Konzentrationen für IL-22BP wie die von anderen löslichen Rezeptoren, welche durch ein eigenständiges Gen kodiert werden, wie beispielsweise das IL-18 Bindungsprotein (IL-18BP), von 0,5-7 ng/ml bei gesunden Kontrollprobanden [169], erscheinen die hier verwendeten Proteinnachweismethoden als zu insensitiv zur quantitativen Bestimmung von IL-22BP in biologischen Proben. Eine mögliche Nutzung dieser sowie eine Etablierung eines IL-22BP-ELISA ist folglich erst bei Verfügbarkeit eines höher affinen IL-22BP-spezifischen, vor allem monoklonalen, Antikörpers denkbar.

## 5 DISKUSSION

### 5.1 Produktion, Zielzellen und Effekte von IL-22 und die Rolle von IL-22BP

IL-22 ist ein im Jahr 2000 entdecktes Mitglied der IL-10–Interferon-Zytokinfamilie [69]. Zu Beginn dieser Arbeit war nur sehr wenig über diesen Mediator bekannt, wie die mRNA- und Proteinsequenz, sowie zwei Zielzelltypen und erste Effekte von IL-22 auf diese. Daher war es das Ziel dieser Arbeit Erkenntnisse über: 1) die Produktion von IL-22, 2) die Zielzellen von IL-22 in Haut und Leber, 3) die Effekte von IL-22 auf die in der Haut und Leber identifizierten Hauptzielzellen sowie 4) die Rolle des IL-22BP zu gewinnen. Diese Resultate sollen im Folgenden in Zusammenhang zueinander und zu anderen publizierten Daten mit besonderem Fokus auf ihre potentielle Bedeutung für die chronisch-entzündlichen Erkrankungen Psoriasis und Morbus Crohn diskutiert werden.

Unsere Arbeitsgruppe konnte bereits 2002 zeigen, daß IL-22-mRNA von aktivierten T- und NK-Zellen produziert wird. Dabei steigerte die Polarisierung der T-Zellen zu Th1-Zellen deren IL-22-mRNA-Expression, während die Polarisierung zu Th2-Zellen oder regulatorischen T-Zellen diese verminderte [58]. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß aktivierte T-Zellen und aktivierte NK-Zellen, nicht jedoch andere Immunzellpopulationen IL-22-Protein sezernieren. So waren große Mengen von IL-22 im Zellkulturüberstand von PBMC nach NK-Zellstimulation und T-Zellstimulation nachweisbar (Abb. 1). Hinsichtlich der Produktion von IL-22 durch aktivierte T-Zellen war diese von einer CD28-vermittelten Kostimulation abhängig. Kürzlich wurde bekannt, daß neben den Th1-Zellen auch weitere neu beschriebene T-Helferzell-Populationen, die Th17-Zellen und die Th22-Zellen, wichtige Produzenten von IL-22 darstellen [81, 97, 99, 104]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zusammen mit den durch andere Gruppen publizierten Daten vermitteln bezüglich der T-Zellen das Bild, daß bei Immunreaktionen IL-22 1) in großen Mengen sezerniert wird und 2) meistens durch mehrere T-Zellpopulationen gleichzeitig produziert wird. Das bedeutet, daß bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen eine Produktion von IL-22 selten ohne gleichzeitige Produktion von IFN- $\gamma$  oder IL-17A zu finden ist. Wie erwartet zeigten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit weiter, daß die NK-Zellstimulation zu einer IFN- $\gamma$ - und IL-22-Produktion, jedoch nicht zu einer IL-17A-Produktion führt (Abb. 1). Interessanterweise war eine Produktion von IL-22 durch andere Immunzellen oder nichthämatopoetische Gewebszellen nicht detektierbar, nicht nach Monozyten- und B-Zellstimulation von PBMC und auch nicht in ruhenden und mittels spezifischer Stimuli aktivierten primären humanen Keratinozyten und Hepatozyten.

Während IL-22 von Immunzellen produziert wird, sind die Zielzellen dieses Zytokins



jedoch ausschließlich nichthämatopoetische Zellen stromaler Gewebe, vor allem des Respirations- und des Gastrointestinalsystems sowie der Haut. Um neben den Keratinozyten als bekannte IL-22-sensitive Zellpopulation weitere Zielzellen von IL-22 in der Haut zu identifizieren und näher zu charakterisieren, war ein zweites Ziel dieser Arbeit die Untersuchung dermalen Fibroblasten, dermalen Endothelzellen und Melanozyten im Vergleich zu Keratinozyten der humanen Haut. Tatsächlich zeigten Keratinozyten wie erwartet eine starke IL-22-Rezeptorexpression und eine IL-22-induzierte Signaltransduktion, welche durch die klare Phosphorylierung von STAT3 nachweisbar war (Abb. 7, 9). Bei einem von vier Experimenten mit Keratinozyten unterschiedlicher Spender bewirkte IL-22 interessanterweise auch eine verstärkte Threonin-/Tyrosinphosphorylierung von Erk1/2 und JNK. Hingegen zeigten die Ergebnisse weiter, daß die anderen hautresidenten Zelltypen keine (Endothelzellen und Melanozyten) bzw. wahrscheinlich keine bedeutenden (ruhende Fibroblasten) Zielzellen von IL-22 sind (Abb. 7, 10). Um möglichst die Gesamtheit der IL-22-Effekte auf die hier identifizierten Hauptzielzellen dieses Zytokins in der Haut, die Keratinozyten, zu erfassen, wurde anschließend eine Genexpressionsarray-Analyse durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, daß IL-22 nur eine geringe Anzahl von Genen in ihrer Expression beeinflusst. Die Anzahl der durch IL-22 in ihrer Expression regulierten Gene lag bei 1%, die der durch IFN- $\gamma$  in ihrer Expression regulierten Gene bei 10% der untersuchten Gene (Abb. 16). Die Ergebnisse zeigten, daß IL-22 drei verschiedene Keratinozytenfunktionen verändert. IL-22 bewirkt durch die Verstärkung der Expression von antimikrobiellen Proteinen und die Regulation von mobilitätsassoziierten Proteinen eine Verstärkung der antimikrobiellen Abwehr der Haut und der Mobilität von Zellen. Durch die Verminderung der Expression von differenzierungsregulierenden Proteinen führt IL-22 zu einer Hemmung der terminalen Differenzierung der Keratinozyten (Abb. 16 und Kapitel 5.2.1). Anhand der untersuchten Wirkung von IL-22 auf die Genexpression von S100A7, CALML5 und MMP1 konnte eine zeitabhängige und dosisabhängige Regulation durch IL-22, welche unabhängig vom Differenzierungszustand der Keratinozyten war, gefunden werden (Abb. 17-19). Die Wirkung von IL-22 war hinsichtlich der Expression von S100A7 und CALML5 ein direkter Effekt (Abb. 20, 21), für die Regulation der Expression von MMP1 jedoch ein indirekter Effekt, welcher vermutlich durch ein endogenes, klassisch sezerniertes Protein, wahrscheinlich einen Liganden der EGF-Rezeptor-Familie vermittelt wird (Abb. 22). Interessanterweise wirkte IL-22 synergistisch mit IL-1 $\beta$  auf die Regulation der Expression von S100A7, CALML5 und MMP1 (Abb. 23). Diese durch IL-22-induzierten Keratinozytenveränderungen scheinen die Regeneration der Haut zu fördern. Die Relevanz der Keratinozyten-spezifischen IL-22-Effekte für die Psoriasis wird ausführlich in Kapitel 5.2.1 diskutiert.

Neben den Keratinozyten als wichtigste Zielzellen von IL-22 in der Haut konnten in dieser Arbeit auch primäre humane Hepatozyten als klare Zielzellen von IL-22 bestätigt werden. So zeigten diese Zellen eine starke IL-22-Rezeptorexpression sowie eine klare Sensitivität gegenüber IL-22, welche durch eine Phosphorylierung von STAT3 und STAT1 nachweisbar war (Abb. 13, 14). Die Untersuchung der Effekte von IL-22 auf Hepatozyten hinsichtlich einer möglichen Veränderung in der Konzentration sezernierter Mediatoren zeigte, daß IL-22 sowohl in primären humanen Hepatozyten als auch in Zellen der humanen Hepatozytenzelllinie HepG2 eine Steigerung der Produktion von LBP induziert (Abb. 26A und Kapitel 5.2.2). Hinsichtlich der Mechanismen der Induktion der LBP-Produktion durch IL-22 wurde eine transkriptionelle und dosisabhängige Regulierung durch IL-22 nachgewiesen (Abb. 27). Vergleichend mit bekannten LBP-Induktoren war der Effekt von IL-22 auf die Produktion von LBP etwas stärker als der Effekt von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , jedoch klar schwächer als der Effekt von IL-6 (Abb. 28). Die Bedeutung der IL-22-induzierten LBP-Produktion wird durch den Vergleich der LBP-Spiegel nach IL-22-Applikation (4-fach) und der LBP-Spiegel nach LPS-Applikation (2,5-fach), welche in der gleichen Größenordnung liegen, deutlich (Abb. 30 und Daten nicht gezeigt). Dieses ist insofern erstaunlich, da LPS eine massive Immunstimulation induziert, welche mit einer Produktion von IL-6, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  einhergeht. Die Relevanz der Hepatozyten-spezifischen IL-22-Effekte für den Morbus Crohn wird ausführlich in Kapitel 5.2.1 diskutiert.

Die Untersuchung der Affinität von IL-22BP zu IL-22 und der Expression dieses löslichen IL-22-Rezeptors war ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit. Die Analyse der Affinität von IL-22BP zu IL-22 mittels SPR-Technologie zeigte, daß IL-22BP ein ca. 10-fach affinerer IL-22-Rezeptor als IL-22R1 und damit ein hochpotenter IL-22-Inhibitor ist. Die etwas geringere Assoziation von IL-22BP an IL-22 im Vergleich zu IL-22R1 zeigt jedoch auch, daß bei simultaner Anwesenheit beider Rezeptorketten IL-22 lokal wirksam ist. Jedoch sind gebildete IL-22BP-IL-22 Komplexe deutlich stabiler ( $K_d < 2 \cdot 10^{-4}$ ) im Vergleich zu Komplexen aus IL-22R1 und IL-22 ( $K_d: 40 \cdot 10^{-4}$ ) [24]. Dies lässt vermuten, daß IL-22BP nach einer initialen Bindung IL-22 praktisch nicht mehr freigibt. *In vitro* konnte dies anhand einer fast vollständigen Verhinderung der IL-22-induzierten LBP-Produktion in Hepatozyten durch eine Vorinkubation gleicher molarer Mengen von IL-22 und IL-22BP bestätigt werden (Abb. 35). Die Analyse der Expression von IL-22BP zeigte interessanterweise, daß deren Expression bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen am Ort der Entzündung vermindert ist (Abb. 36). Dies wurde sowohl für die läsionale psoriatische Haut gegenüber der Haut gesunder Kontrollprobanden als auch für den Kolon bei Mäusen mit DSS-induzierter Kolitis gegenüber Kontrolltieren, nicht jedoch für die drainierenden Lymphknoten dieser Tiere gefunden. Parallel zu der verminderten

Expression von IL-22BP war in den psoriatischen Läsionen und im Kolon der DSS-behandelten Mäuse die Expression von IL-22 und damit die lokale IL-22/IL-22BP-Ratio stark erhöht [109], (Abb. 6A). Die Reduktion der Expression von IL-22BP am Ort der Entzündung lässt dieses als einen wichtigen Mechanismus vermuten, die Wirksamkeit von IL-22 zu regulieren.

## **5.2 Mögliche Relevanz der IL-22-Effekte für chronisch-entzündliche Erkrankungen**

Die präferentielle Expression von IL-22 durch insbesondere aktivierte T-Zellen wirft die Frage nach einer möglichen Rolle von IL-22 bei Erkrankungen, welche durch eine chronische Aktivierung dieser Zellen gekennzeichnet sind, auf. Tatsächlich wurde im Vorfeld dieser Arbeit durch unsere und andere Arbeitsgruppen gezeigt, daß die mRNA-Expression von IL-22 bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie Psoriasis, Atopische Dermatitis und Morbus Crohn lokal im entzündeten Gewebe massiv erhöht ist [109, 116, 117]. Als wichtige pathogene Zellpopulationen bei organspezifischen chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie Psoriasis und Morbus Crohn werden neben den Th1-Zellen auch die kürzlich identifizierten Th17- und Th22-Zellen vermutet [102, 170].

### **5.2.1 Mögliche biologische Rolle von IL-22 bei Psoriasis**

Psoriasis (Schuppenflechte) ist eine chronisch-entzündliche Erkrankung der Haut unter der etwa 1,5% der kaukasischen Bevölkerung leiden und welche phänotypisch durch scharf abgegrenzte, leicht erhabene erythematöse Läsionen (Plaques) mit einer starken Schuppenbildung gekennzeichnet ist [156]. Histologisch zeigen diese Läsionen eine vermehrte dermale Gefäßbildung und -erweiterung in den Papillen, sowie eine Infiltration von neutrophilen Granulozyten, Monozyten/Makrophagen, DCs und T-Zellen. Während CD4<sup>+</sup> T-Zellen vor allem in der Dermis und CD8<sup>+</sup> T-Zellen vornehmlich in der Epidermis lokalisiert sind, befinden sich Ansammlungen neutrophiler Granulozyten-Infiltrate (Munro's Mikroabszesse) in der Hornschicht (*Stratum corneum*). Das Hauptcharakteristikum psoriatischer Hautläsionen sind jedoch die Keratinozytenveränderungen: eine vergrößerte Zahl von Keratinozytenschichten in der Epidermis (Akanthose) mit massiver Verlängerung der Reteleisten, ein Verlust der Granulärschicht (*Stratum granulosum*) und damit der Zahl der Keratohyalingranula (Hypogranularität), ein Verbleib von Zellkernen in den Korneozyten (Parakeratose), den Zellen des *Stratum corneum* und eine Verdickung des *Stratum corneum* (Hyperkeratose) [156]. Die Ursache für die Verlängerung der Reteleisten und die Akanthose scheint vornehmlich in einer Hyperproliferation der basalen

Keratinocyten zu liegen. Die Hemmung der terminalen Differenzierung der Keratinocyten der oberen Epidermisschichten trägt ebenfalls massiv zur Akanthose bei und ist die Ursache für Hypogranularität, Hyperkeratose und Parakeratose. Weiterhin ist die vermehrte Produktion von antimikrobiellen und migrationsfördernden Proteinen ein wichtiges Merkmal psoriatischer Hautläsionen. Die Psoriasis kann somit als ein pathologisch veränderter regenerativer Prozeß bzw. eine übersteigerte Form der Wundheilung verstanden werden. Obwohl die Pathogenese der Psoriasis bisher noch nicht vollständig aufgeklärt ist, scheint eine genetisch bedingte Prädisposition eine Rolle bei der Entwicklung dieser Erkrankung zu spielen. So besteht beispielsweise eine Assoziation der Psoriasis mit bestimmten HLA-Haplotypen [171, 172] und Polymorphismen der Gene für IL-23R oder IL-12p40 [173, 174]. Als Auslösemechanismen für die Entstehung bzw. für die stetig wiederauftretenden Krankheitsschübe werden Streptokokken-Antigene als Basis eines immunologisch ausgelösten Prozesses [175], mechanische Irritation [176] und bestimmte Medikamente [177] diskutiert. Neben symptomatischen Therapien u.a. mit Vitamin-D3-Derivaten oder UV-Licht steht die Entwicklung zielgerichteter Therapien für die Behandlung der Psoriasis noch am Beginn. Obwohl bereits einige der sogenannten biotechnologisch hergestellten Substanzen (Biologika) erfolgreich eingesetzt werden, weisen diese aber zum Teil durch die Beeinflussung des Immunsystems unerwünschte Nebenwirkungen auf [178]. Die detaillierte Aufklärung der Psoriasis-Pathogenese auf molekularer Ebene ist daher wichtig, um neue Therapiestrategien zu entwickeln.

Zusammen mit früheren Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe tragen die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse zu einem Gesamtbild von IL-22 als Schlüsselmediator der finalen Phase der Psoriasis-Pathogenese, in welcher sich die Keratinocytenveränderungen ausbilden, bei. Parallel zu der massiv erhöhten IL-22-Expression ist die Expression des IL-22-Inhibitors IL-22BP in den psoriatischen Läsionen stark vermindert. Die daraus resultierende erhöhte IL-22/IL-22BP-Ratio (Abb. 36A) begünstigt die lokale Wirksamkeit von IL-22 in den Hautläsionen. Wie erwähnt sind Keratinocyten die Hauptzielzellen von IL-22 in der Haut. In diesen Zellen bewirkt IL-22 eine Veränderung von drei Keratinocytenfunktionen welche die Regeneration dieser Zellen fördern und dem gestörten regenerativen Phänotyp der Keratinocyten bei der Psoriasis gleicht [156]: Es bewirkt eine Hemmung der terminalen Differenzierung, eine Förderung der Migration von Zellen und eine Verstärkung der antimikrobiellen Abwehr (Abb. 16). IL-22 reduzierte die Expression der mit der terminalen Differenzierung assoziierten Proteine FLG, KRT1, KRT10, CALML5, KDAP, KLK7 und DSC1 (Abb. 16). Die terminale Differenzierung von Keratinocyten führt in der gesunden Haut zur Bildung einer mechanischen und physikalischen Barriere, wobei diese neben den Korneozyten

auch durch lamellare Schichten charakteristischer Lipide gebildet wird. Die terminale Differenzierung der Keratinozyten zu abgestorbenen, aus einer Proteinhülle („cornified envelope“) bestehenden Korneozyten beinhaltet die Auflösung des Zellkerns und anderer Organellen sowie die Aggregation von Keratin-Intermediärfilamenten zu Makrofibrillen [179]. FLG stellt ein Prä-Protein dar, welches während der terminalen Differenzierung durch die Wirkung von Proteasen zu einem N-terminalen Peptid und mehreren Kopien von Filaggrin gespalten wird. Während das N-terminale Peptid in den Kern transloziert und zu dessen Auflösung beiträgt, bindet Filaggrin an die zytoplasmatischen Keratin-Intermediärfilamente und vermittelt deren Aggregation zu Makrofibrillen [180]. Hierbei sind vor allem die Keratine KRT1 und KRT10 bedeutsam, deren Expression ebenfalls durch IL-22 herabreguliert war. Die Bedeutung dieser Keratine zeigt sich beispielsweise bei einem Gen-Knockout von KRT10 in der Maus, welcher mit einem Hautphänotyp eines schweren Verlustes der Integrität einhergeht [181]. CALML5 ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -bindendes Protein, welches mit der Transglutaminase 3, einem Schlüsselenzym der terminalen Differenzierung, interagiert [182]. Transglutaminasen vermitteln die Quervernetzung der Proteine, welche den „cornified envelope“ bilden, wie Keratine, Filaggrin, Loricrin und Involucrin. KDAP ist ein erst kürzlich identifiziertes Protein mit bislang unbekannter Funktion und einer suprabasalen Expression [183]. KLK7 ist eine Serinprotease, welche an der physiologischen Abschuppung der Korneozyten vom *Stratum corneum* beteiligt ist, indem es die beiden adhäsiven Proteine des extrazellulären Teils der Korneodesmosomen, Corneodesmosin und DSC1 schneidet [184]. Interessanterweise war auch die Expression von DSC1 durch IL-22 vermindert. Die an diese Arbeit anknüpfenden Untersuchungen der IL-22-Effekte im dreidimensionalen humanen Epidermismodell zeigen eindrucksvoll die Konsequenz einer verminderten terminalen Differenzierung der Keratinozyten durch IL-22 [185]. Bereits nach einer 3-tägigen IL-22-Behandlung wurde eine deutliche Akanthose mit einer Parakeratose und Hypogranularität in diesen Epidermiskulturen sichtbar. Dies lässt vermuten, daß IL-22 bei der Psoriasis direkt pathogenetisch wirkt.

Zur Gruppe der in der vorliegenden Arbeit identifizierten, durch IL-22 in Keratinozyten differentiell exprimierten Mobilitäts- und Migrations-assoziierten Gene zählen MMP1, MMP3 und ANXA9, wobei IL-22 die Expression von MMP1 und MMP3 induzierte und die Expression von ANXA9 verminderte (Abb. 16). Metalloproteinasen stellen eine Familie strukturell ähnlicher, Zink-abhängiger neutraler Endopeptidasen dar, welche die extrazelluläre Matrix abbauen. Während MMP1 vorwiegend fibrilläres Kollagen Typ I spaltet und essentiell für die Initiation der Keratinozytenmigration ist, besitzt MMP3 eine breitere Substratspezifität und spielt als essentieller Faktor beim Aufbau des Aktin-Netzwerkes vorwiegend eine Rolle bei der Wundkontraktion [186, 187]. Eine temporäre Degradation der extrazellulären Matrix stellt wahrscheinlich auch einen wichtigen

Mechanismus zur Förderung der Infiltration von Immunzellen dar. So zeigen MMP3-defiziente Mäuse eine verminderte Migration von Immunzellen zum Infektionsort [188]. ANXA9 ist ein neues Mitglied der Annexin-Familie, welche  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängig Phosphatidylserin bindet [189]. Mitglieder der Annexin-Familie spielen eine Rolle bei der Regulation der Dynamik des Aktin-Zytoskeletts [190]. Dieses wird bei vielen Prozessen wie Mobilität und Endozytose umorganisiert.

IL-22 scheint kein potenter Induktor von für die direkte Attraktion von Immunzellen verantwortlichen Chemokinen in Keratinozyten zu sein. In den in dieser Arbeit genutzten klassischen humanen Keratinozytenkulturen induzierte IL-22 nicht die Expression von CXCL1, CXCL2, CXCL8, CXCL9, CXCL14, CXCL16, CCL2, CCL3, CCL8, CCL13, CCL17, CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL26 und CCL27 (Abb. 16). Eine schwache Induktion von CXCL8 durch IL-22-Stimulation zeigte sich im dreidimensionalen humanen Epidermismodell [185].

Neben der Hemmung der Differenzierung der Keratinozyten und der Förderung ihrer Mobilität induziert IL-22 die Expression von antimikrobiellen Proteinen in Keratinozyten und stärkt damit die angeborene Abwehr der Haut [109], (Abb. 16). Zur Gruppe dieser antimikrobiellen Proteine zählen S100A7, S100A8 und S100A9 (Abb. 16). Während S100A7 ein wichtiges Schlüsselmolekül bei der Abwehr der Haut gegen *E. coli*-Infektionen darstellt [191], richtet sich die antimikrobielle Aktivität von S100A8 und S100A9 gegen *Candida albicans* [192] sowie gegen einige Gram-negative (*E. coli*, *Borrelia burgdorferi*) und Gram-positive (*Staphylococcus aureus*) Bakterien [193, 194]. Bereits in einer früheren Arbeit unserer Gruppe konnte gezeigt werden, daß IL-22 die Expression der antimikrobiell wirkenden Proteine BD2 und BD3 in Keratinozyten induziert [109]. Diese Funktion von IL-22 scheint jedoch nicht auf die Epidermis beschränkt zu sein. Neuere Arbeiten zeigen, daß IL-22 auch in Kolonepithelzellen die Expression der antimikrobiellen Proteine S100A8, S100A9, sowie RegIII $\beta$  and RegIII $\gamma$  steigert [195]. Während RegIII $\gamma$  gegen Gram-positive Bakterien wirkt, trägt RegIII $\beta$  zur Abwehr von Gram-negativen Bakterien bei [143, 196, 197]. Die Bedeutung von IL-22 für die Abwehr des Gram-positiven Bakteriums *Citrobacter rodentium* wurde durch IL-22-defiziente Mäuse untermauert, welche einen Mangel an RegIII-Proteinen aufweisen und zum großen Teil der *C. rodentium*-Infektion erlagen [195]. Eine weitere kürzlich erschienene Arbeit zeigte eine Induktion von Lipocalin-2 durch IL-22 in murinen trachealen Epithelzellen, was zu einem stark verminderten Wachstum von *Klebsiella pneumoniae* führte [111]. Hinsichtlich der Wirkmechanismen sind die durch IL-22 induzierten antimikrobiellen Proteine sehr unterschiedlich. Während  $\beta$ -Defensine durch eine Destabilisierung der mikrobiellen Membran wirken, beruht die antimikrobielle Aktivität von S100A7, S100A8, S100A9 und Lipocalin-2 auf Entzug der wichtigen Spurenelemente Zink (S100A8,

S100A9) und Eisen (Lipocalin-2). RegIII $\gamma$  wirkt durch die Interaktion mit Peptidoglykan direkt gegen Gram-positive Bakterien [196]. Die Induktion von antimikrobiellen Mediatoren mit unterschiedlichen Wirkmechanismen zeigt, daß IL-22 sehr effizient die antimikrobielle Abwehr steigert und einen wichtigen Mediator der angeborenen Abwehr der Epithelien darstellt. Die Induktion vieler verschiedener antimikrobieller Proteine durch IL-22 in Keratinozyten reflektiert die massiv gestärkte Abwehr der Haut von Psoriasis-Patienten, bei denen trotz der gestörten Barrierefunktion selten Hautinfektionen auftreten.

Interessanterweise wurden die hier beschriebenen Ergebnisse zwischenzeitlich auch durch Publikationen anderer Arbeitsgruppen bestätigt. So zeigten Boniface *et al.* eine gesteigerte Expression von S100A7, S100A8, S100A9 und MMP3, sowie eine verminderte Expression von Proteinen, welche mit der terminalen Differenzierung assoziiert sind, durch IL-22 in Keratinozyten [132].

Der Vergleich der mittels Genexpressionsarray-Analyse identifizierten Effekte von IL-22 und IFN- $\gamma$  zeigte, daß IFN- $\gamma$  die Expression von zahlreichen Chemokinen, MMPs, Adhäsionsmolekülen und Elementen des MHC Klasse I und II Pathways in Keratinozyten reguliert (Abb. 16). Hingegen bewirkte IFN- $\gamma$  keine wesentliche Regulation der Expression von antimikrobiellen Proteinen (Abb 16). Dies lässt vermuten, daß IFN- $\gamma$ , im Gegensatz zu IL-22, eine Rolle bei der Aktivierung von Antigen-präsentierenden Zellen und bei der Auslösung der Immunzellinfiltration spielt, nicht jedoch direkt bei der Entstehung der Psoriasis-typischen Keratinozytenveränderungen. Damit vermitteln die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse mit den zuvor publizierten Daten über IL-22, IFN- $\gamma$ , IL-17A und TNF- $\alpha$  den Eindruck, daß die Entstehung der psoriatischen Läsionen einen mehrstufigen Prozeß darstellt [185]. In der proximalen Effektorphase der Psoriasis-Pathogenese initiiert TNF- $\alpha$  durch die Induktion von Chemokinen für die Attraktion von Th1-Zellen, Th17-Zellen, Macrophagen, DCs und neutrophilen Granulozyten wahrscheinlich den Infiltrationsprozeß. In dieser Phase scheinen auch die T-Zell-Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-17A wichtig zu sein. Tatsächlich bewirkt IFN- $\gamma$  die Induktion von Th1-Zell-wirksamen Chemokinen und eine Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen, während IL-17A ein starker Induktor von Chemokinen für die Attraktion von neutrophilen Granulozyten ist und daher wahrscheinlich eine bedeutende Rolle bei der Entstehung der typischen Munro's Mikroabszesse spielt. IL-22 hingegen ist bedeutend für die distale, finale Effektorphase der Psoriasis-Pathogenese, indem es direkt die Entstehung der Keratinozytenveränderungen bewirkt.

Des Weiteren konnte hier erstmals gezeigt werden, daß auch die systemischen Spiegel von IL-22 bei der Psoriasis stark erhöht sind, daß diese mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelieren und daß eine erfolgreiche anti-psoriatische Therapie zu einer Reduktion der kutanen und systemischen IL-22-Spiegel führt (Abb. 4). Interessanterweise

waren die Plasmaspiegel von IFN- $\gamma$ , IL-17A und IL-1 $\beta$  bei diesen Patienten nicht erhöht. Dadurch, daß IL-22 bei der Psoriasis nicht nur lokal sondern auch systemisch erhöht vorhanden ist, könnte IL-22 neben einer lokalen Rolle bei der antimikrobiellen Abwehr, welche zu einem lokalen und unmittelbaren Schutz der läsionalen Haut beiträgt, auch eine systemische Wirkung wie z.B. die Induktion von antimikrobiellen Proteinen in entfernt gelegenen Geweben entfalten. Somit könnte IL-22 einen prophylaktischen Schutz für abseits der lokalen Entzündung und dem Produktionsort von IL-22 gelegene Gewebe, wie der nicht-läsionalen Haut, der Lunge oder dem Magen-Darmtrakt, vermitteln. Zweifellos unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit eine mögliche systemische Wirkung von IL-22. So führte bereits 1  $\mu$ g IL-22 i.p. zu einer klar verstärkten kutanen Expression von S100A8, S100A9 und MMP1 in den behandelten Mäusen (Abb. 25). Interessant ist jedoch, ob IL-22 bei der Psoriasis tatsächlich systemisch aktiv ist oder gebunden an z.B. seinen natürlichen Inhibitor IL-22BP vorliegt. Dies soll in den nachfolgenden Arbeiten geklärt werden.

### 5.2.2 Mögliche biologische Rolle von IL-22 bei Morbus Crohn

Zusammen mit *Colitis ulcerosa* zählt Morbus Crohn zur Gruppe der chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und ist durch eine Entzündung der Darmschleimhaut gekennzeichnet. In Europa leiden ca. 0,08-0,15% der Bevölkerung an Morbus Crohn [198]. Bei dieser Erkrankung kann der gesamte Verdauungstrakt von der Mundhöhle bis zum Rektum betroffen sein, wobei bevorzugt ein segmentaler Befall des terminalen Ileums und Kolons auftritt. Die charakteristischerweise durch gesundes Gewebe voneinander abgegrenzten Läsionen stellen transmural ausgedehnte, die komplette Schleimhaut durchzogene, entzündete und granulomatöse Areale dar. Diese sind durch einen Schleimhautumbau mit Verlust von Epithelzellen (Enterozyten), Becherzellen und Krypten sowie durch eine Infiltration von aktivierten Immunzellen, wie DCs und T-Zellen gekennzeichnet [199, 200, 201]. Weiter zählen die Bildung von Fisteln und Ulzerationen zum Krankheitsbild des Morbus Crohn. Die Patienten leiden unter vielfältigen Symptomen wie Müdigkeit, Schmerzen im rechten Unterbauch, Durchfall, Fieber, Übelkeit und Erbrechen. Die durch die Entzündung hervorgerufene Zerstörung des resorptionsfähigen Darmepithels führt bei Morbus-Crohn-Patienten zu einer Beeinträchtigung der Resorption und einer damit verbundenen Mangelversorgung an Nährstoffen, Vitaminen, Mineralien und Spurenelementen, was folglich zu Anämie und Gewichtsverlust führt [199, 201].

Als Ursache der chronischen Entzündung werden sowohl eine genetische Suszeptibilität als auch eine Dysregulation der Balance zwischen einer Immunantwort auf Pathogene und einer Toleranz gegenüber kommensalen Enterobakterien und



Nahrungsmittelantigenen diskutiert, welche in einer gestörten Barrierefunktion des Darmepithels resultiert. Der zugrunde liegende Defekt wird dabei unter anderem in einer Veränderung von „Pattern Recognition Rezeptoren“, welche für die Erkennung von Mikroorganismen bedeutsam sind, auf der Oberfläche intestinaler Epithelzellen angenommen. Weiter wird auch die Beteiligung einer Infektion mit *Mycobacterium paratuberculosis* als Auslösefaktor für den Morbus Crohn diskutiert [202]. Obwohl der genaue Mechanismus der Pathogenese noch nicht vollständig geklärt ist, konnte gezeigt werden, daß Th1-Zellen und Th17-Zellen auch bei dieser Erkrankung eine wichtige Rolle spielen [203, 204]. Neben konventionellen Therapien, welche hauptsächlich durch Abschwächung der Entzündungsreaktion oder Induktion einer Immunsuppression wirksam sind (Glukokortikoide, Azathioprin), gibt es nur wenige zielgerichtete Therapien. Diese schließen Substanzen ein, die ebenfalls erfolgreich bei der Behandlung der Psoriasis eingesetzt werden (Biologika wie z.B. Anti-TNF- $\alpha$ -Ak) und wie bereits erwähnt durch die Beeinflussung des Immunsystems zum Teil unerwünschte Nebenwirkungen aufweisen [205]. Die Aufklärung der Pathogenese des Morbus Crohn ist daher von großer Bedeutung für die Entwicklung innovativer Therapiemöglichkeiten auch für diese Erkrankung.

IL-22 scheint bei Morbus Crohn eine wichtige Rolle zu spielen. Erstens ist IL-22 in den entzündeten Arealen der Darmmukosa von Patienten mit aktivem Morbus Crohn, nicht jedoch von gesunden Probanden stark exprimiert, wobei CD4<sup>+</sup> T-Zellen hier die zelluläre Quelle von IL-22 darstellen [116, 117]. Zweitens geben die in neueren Arbeiten publizierten Untersuchungen der Effekte von IL-22 auf intestinale Epithelzellen und subepitheliale Myofibroblasten Hinweise auf eine bedeutende lokale Rolle von IL-22 bei Morbus Crohn [116, 117]. Eine detaillierte Untersuchung der IL-22-Effekte auf primäre humane subepitheliale Myofibroblasten des Darmes mittels Microarray-Analyse zeigte, daß IL-22 in diesen Zellen die Expression von anti-inflammatorischen und protektiv wirkenden Proteinen (Follistatin, IL-11, LIF) und Chemokinen (CCL7, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL6, CXCL8) fördert [116]. Im Weiteren bewirkte IL-22 in diesen Zellen eine Steigerung der Expression von IL-6, von MMPs (MMP1, MMP3, MMP10) und von Proteinen, welche die Proliferation von Epithelzellen (Amphiregulin) sowie die Signaltransduction (SOCS2) und den Metabolismus (Stanniocalcin 1) regulieren. IL-22 wirkte hier in Synergie mit IL-17A im Hinblick auf die Steigerung der Expression von IL-11, CXCL8, IL-6 und LIF. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, daß IL-22 zwar wahrscheinlich durch eine Verstärkung der Migration dieser Zellen und durch die Induktion von TNF- $\alpha$  und einiger Chemokine teilweise pathogenetisch wirken könnte, jedoch durch die Induktion anti-inflammatorischer und protektiv wirkender Proteine wahrscheinlich eine protektive Rolle bei dieser Erkrankung spielt [116, 117]. Die lokale Rolle von IL-22 bei

Morbus Crohn könnte somit in einer Förderung der Regeneration der Darmschleimhaut liegen. Diese Vermutung steht im Einklang mit der in mehreren neueren Arbeiten gezeigten regenerativen Wirkung von IL-22 bei entzündlichen Prozessen [118, 120, 206]. So wurde erst kürzlich bekannt, daß IL-22 eine Induktion der Schleimhüllenproteine Muc1, Muc3, Muc10 und Muc13 in intestinalen und auch in trachealen Epithelzellen bewirkt und in murinen Modellen Th1- und Th2-vermittelter experimenteller Kolitis die Regeneration von Darmepithelzellen fördert [111, 118, 206].

Neben der bekannten massiven lokalen Expression von IL-22 in den intestinalen Läsionen, konnte in dieser Promotionsarbeit erstmal gezeigt werden, daß auch die systemischen Spiegel von IL-22 bei Morbus Crohn stark erhöht sind und mit dem Schweregrad der Erkrankung korrelieren (Abb.5). Hingegen war keine Erhöhung von IFN- $\gamma$ , IL-17A und IL-1 $\beta$  im Plasma dieser Patienten zu finden. Untersuchungen am murinen Modell der DSS-induzierten Kolitis lassen vermuten, daß diese systemischen IL-22-Spiegel bei Morbus Crohn hauptsächlich von den aktivierten Lymphozyten des intestinalen Infiltrats gebildet werden. Die experimentelle, DSS-induzierte Kolitis stellt ein murines Modell für den Morbus Crohn dar. Die Gabe des chemischen Agens DSS im Trinkwasser induziert hier eine akute Entzündung der intestinalen Mukosa, welche zu einem Verlust von Epithelzellen (Enterozyten), Becherzellen und Krypten, zu blutigen Durchfällen, Gewichtsverlust, Verkürzung des Kolons, mukosalen Ulzerationen und einer Infiltration neutrophiler Granulozyten und Lymphozyten führt [207]. Mittels dieses Modelles konnte in dieser Arbeit neben der massiven Produktion von IL-22 am Entzündungsort (Kolon) auch eine gesteigerte Expression von IL-22 in den drainierenden Lymphknoten nachgewiesen werden (Abb. 6B). Die Expression des löslichen IL-22-Rezeptors IL-22BP war bei den Kontrolltieren sowohl in den Lymphknoten als auch im Kolon sehr stark (Abb. 36B). Interessanterweise war die IL-22BP-Expression im entzündeten Kolon, nicht jedoch in den drainierenden Lymphknoten der DSS-behandelten Tiere im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich vermindert (Abb. 36B). Wie bei der psoriatischen Haut ist hier somit von einer erhöhten IL-22/IL-22BP-Ratio im entzündeten Gewebe auszugehen, was die lokale Wirksamkeit von IL-22 begünstigt.

Durch die in dieser Promotionsarbeit generierten Resultate kann postuliert werden, daß bei Morbus Crohn IL-22 systemisch aktiv ist und die hepatozytäre Produktion von LBP und damit erhöhte systemische LBP-Spiegel induziert. Bereits eine einmalige i.p. Gabe von 1  $\mu$ g IL-22 führte zu signifikant erhöhten systemischen LBP Spiegeln in den behandelten Mäusen (Abb. 30B). Weiterhin sind bei Morbus-Crohn-Patienten ebenfalls signifikant erhöhte LBP-Spiegel im Blut nachweisbar (Abb. 32). Die Bildung von LBP durch IL-22 wird vornehmlich durch eine Produktion in der Leber, nicht in der Niere oder Lunge induziert (Abb. 30A), wobei IL-22 hier sehr wahrscheinlich synergistisch mit

anderen Zytokinen, welche im Blut von Morbus-Crohn-Patienten systemisch nachweisbar sind, wirkt.

LBP ist ein löslicher Rezeptor für mikrobielle Oberflächenstrukturen („Pattern Recognition Rezeptor“), welcher konstitutive Plasmaspiegel aufweist [164, 208]. Während bakterieller Infektionen kann die Plasmakonzentration von LBP bis auf das 10-Fache ansteigen, wobei dieser Anstieg vor allem, wie in dieser Arbeit für IL-22 gezeigt, vorwiegend durch eine transkriptionelle Regulation in der Leber bedingt ist [209]. Die biologische Funktion von LBP ist von der Konzentration dieses Plasmaproteins abhängig. So vermittelt LBP bei konstitutiven Konzentrationen die Erkennung von Bakterienbestandteilen und trägt durch die Aktivierung von Monozyten, Makrophagen, DCs und Endothelzellen dazu bei, eine angemessene Entzündungsreaktion auszulösen [165]. LBP ist dabei in der Lage, bakterielle Komponenten wie LPS, Peptidoglykan und Lipoteichonsäure zu binden und katalysiert deren Transfer an zelluläre Pattern Recognition Rezeptoren, welche aus der Membran-gebundenen oder löslichen Form von CD14 und Mitgliedern der Toll-like Rezeptor Familie aufgebaut sind. Dies führt zur Aktivierung der Zielzellen und damit zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies, Chemokinen und inflammatorischen Zytokinen, wie IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  [165, 210, 211]. Im Gegensatz zur konstitutiven Funktion von LBP bewirken hohe systemische Spiegel eine Neutralisierung bakterieller Bestandteile und damit eine Limitierung der immunstimulatorischen Kapazität dieser Bestandteile [212, 213, 214]. So bewirkt die Gabe hoher LBP-Dosen einen Schutz vor LPS-induziertem septischen Schock bei Mäusen. In D-Galaktosamin-sensibilisierten LPS-behandelten Mäusen sowie in einem Modell muriner *E. coli*-Bakteriämie bewirkte eine i.p. Gabe von LBP eine Hemmung der LPS-vermittelten Zytokinproduktion und führte zu einer Verhinderung von Leberversagen und einer verminderten Mortalitätsrate der Mäuse [213]. Eine weitere Funktion von LBP besteht in der Opsonierung von Bakterien und der Steigerung der Phagozytosekapazität von Monozyten und Makrophagen, was die Beseitigung von Bakterien fördert [215, 216]. Dieser Effekt scheint, soweit bekannt, jedoch nicht konzentrationsabhängig zu sein.

Die verstärkte hepatozytäre Produktion von LBP und die damit verbundene Erhöhung der systemischen LBP-Spiegel durch IL-22 könnte einen Mechanismus darstellen, welcher durch die Neutralisierung von LPS dazu beiträgt, daß eine massive systemische Reaktion auf LPS, welches bei Morbus Crohn durch Translokation aus dem Darm aufgrund der geschädigten Darmbarriere systemisch vorliegt, verhindert wird [217].

Es ist denkbar, daß IL-22 auch in anderen entzündlichen Erkrankungen, wie bakteriellen Infektionen, zu einer Erhöhung der LBP-Spiegel beiträgt. Den daraus resultierenden Nutzen für den Organismus könnte man sich folgendermaßen vorstellen. IL-22 wird hauptsächlich von aktivierten Th-Zellen produziert. Die Bildung dieser Zellen erfolgt in

einer späten, der adaptiven Phase der Immunreaktion als Antwort auf die bakterielle Infektion. In dieser Phase wird die initial induzierte Entzündungsreaktion nicht länger benötigt und infolgedessen durch verschiedene Mechanismen limitiert. Möglicherweise stellt die Induktion der LBP-Produktion durch IL-22 einen solchen Mechanismus dar. Passend zu dieser Hypothese waren die maximalen LBP-Spiegel in den IL-22-behandelten Mäusen erst 48 h nach Applikation zu verzeichnen (Abb. 30B). Dies lässt vermuten, daß die hohen, durch T-Zell-produziertes IL-22 induzierten LBP-Spiegel in der späten Phase der Immunreaktion zu einer Neutralisierung von LPS und anderer bakterieller Komponenten und zur Förderung der Phagozytose und der damit verbundenen Beseitigung von Pathogenen beitragen. IL-22 könnte demnach einen durch das adaptive Immunsystem produzierten Mediator darstellen, welcher die Entzündungsreaktion limitiert und gleichzeitig die Beseitigung der Erreger durch angeborene Mechanismen (Induktion von antimikrobiellen Proteinen, Steigerung der Phagozytose durch Induktion von LBP) steigert.

### **5.3 Bedeutung von IL-22 als Zielmolekül bei der Behandlung chronisch-entzündlicher Erkrankungen**

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zusammen mit Daten aus den Arbeiten anderer Gruppen vermitteln den Eindruck, daß die biologische Rolle von IL-22 vornehmlich 1) in seiner regenerativen Wirkung auf Gewebezellen und 2) der Steigerung der angeborenen Abwehr liegt. Tatsächlich führt IL-22 in entsprechenden Gewebezellen zur Differenzierungshemmung, Steigerung der Mobilität, Steigerung der Produktion von antimikrobiellen Proteinen, Akut-Phase-Proteinen, Mukosa-protectiven Schleimhüllenproteinen (Mucinen) und regenerativen Zytokinen (LIF, IL-11). Dies wird begleitet durch eine leicht inflammatorische Komponente (Induktion der Synthese inflammatorischer Zytokine wie IL-6, CXCL8, TNF- $\alpha$ ) [110, 116, 117, 118, 218]. Die potentielle Signifikanz der Wirkungen von IL-22 zeigt sich bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen. Bei der Psoriasis steht vor allem der (IL-22-induzierte) regenerative Phänotyp der Keratinozyten, welcher durch eine verminderte terminale Differenzierung und eine gesteigerte Mobilität gekennzeichnet ist, im Vordergrund und bildet die Ursache für die klinisch sichtbaren Hautveränderungen in der finalen Phase der Pathogenese bei dieser Erkrankung, welche als ein überschießender Wundheilungsprozeß verstanden werden kann. Die wesentliche Rolle von IL-22 als Schlüsselmediator bei der Pathogenese der Psoriasis wird neben den Publikationen unserer Arbeitsgruppe [109, 110, 185, 219], zu denen vier Ergebnisse dieser Promotionsarbeit beigetragen haben, durch eine kürzlich

publizierte Arbeit von Ma *et al.* unterstrichen, welche zeigt, daß die Blockierung von IL-22 durch neutralisierende Anti-IL-22-Ak in einem murinen Psoriasis-Modell, welches durch einen adoptiven Transfer von CD4<sup>+</sup>CD45RB<sup>++</sup>CD25<sup>-</sup> T-Zellen in Pathogen-freie *scid/scid* Mäuse induziert wurde, die Entwicklung der pathologischen Hautveränderungen verhindert [115]. Bei Morbus Crohn scheinen dagegen die protektiven und regenerativen Komponenten der IL-22-Wirkung lokal im Darm nicht ausreichend zu sein. Es ist jedoch möglich, daß IL-22 durch die systemische Wirkung die hepatozytäre LBP-Produktion zu steigern, bei dieser Erkrankung zu einer Neutralisierung von durch die gestörte Darmbarriere ins Blut translozierten bakteriellen Bestandteilen und damit zur lokalen Begrenzung der Entzündung beiträgt.

Ausgehend von diesen Beobachtungen wäre eine IL-22-Neutralisierung (Psoriasis) bzw. IL-22-Applikation (Morbus Crohn) ein innovativer Therapieansatz für die Behandlung dieser Erkrankungen. Für eine Blockierung von IL-22 bei der Psoriasis wäre der lösliche Rezeptor IL-22BP besonders geeignet. Dieser stellt, wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, einen potenten negativen Regulator der IL-22-Aktivität dar. Eine therapeutische Intervention durch den Einsatz von rIL-22BP wäre auch gegenüber einer möglichen Ak-Therapie aufgrund der geringen zu erwartenden Bildung von Ak gegen dieses körpereigene Protein und der hohen Stabilität der IL-22-IL-22BP-Komplexe von Vorteil. Eine Neutralisierung von IL-22 wäre wahrscheinlich auch nicht mit Nebenwirkungen durch eine direkte Beeinflussung von Immunzellen assoziiert, da diese Zellen nicht den IL-22-Rezeptor exprimieren.

Im Gegensatz zu Psoriasis und Morbus Crohn ist die Rolle von IL-22 bei anderen entzündlichen Erkrankungen dagegen noch weitgehend unklar. So weiß man bislang wenig über eine mögliche direkte Rolle von IL-22 bei der Multiplen Sklerose und der Rheumatoiden Arthritis, wobei eine CCL2-induzierende Wirkung von IL-22 sowohl in Endothelzellen aus Läsionen von Multiple-Sklerose-Patienten als auch in synovialen Fibroblasten von Patienten mit Rheumatoider Arthritis beschrieben wurde [123, 124]. Hinweise auf die Bedeutung von IL-22 bei der Rheumatoiden Arthritis könnten aus Untersuchungen anhand der Kollagen-induzierten Arthritis, einem murinen Modell der Rheumatoiden Arthritis, abgeleitet werden [220]. Hier zeigten IL-22-defiziente Mäuse einen weniger schweren Verlauf der Erkrankung, welcher jedoch interessanterweise auch mit einer erhöhten Produktion von Typ II Kollagen-spezifischen Ak und Gesamt-IgG assoziiert war. Keine direkte Rolle scheint IL-22 hingegen beim Krankheitsverlauf der experimentellen Autoimmunenzephalomyelitis, einem murinen Modell für Multiple Sklerose, zu spielen wie auch mittels IL-22-defizienter Mäuse gezeigt werden konnte [125]. Eine protektive Rolle von IL-22 wird bei der Experimentellen Autoimmunmyokarditis vermutet, wie die effektive Gentherapie dieser Modellerkrankung in der Ratte mit IL-22-Ig

zeigte [122]. Die detaillierte Erforschung der Rolle von IL-22 bei diesen und weiteren chronisch-entzündlichen Erkrankungen könnte das Behandlungsspektrum dieser Erkrankungen um eine Therapiemöglichkeit mit einem geringen zu erwartenden Nebenwirkungsprofil erweitern.

## LITERATURVERZEICHNIS

- [1] Mott, H. R. und Campbell, I. D. (1995): Four-helix bundle growth factors and their receptors: protein-protein interactions, Curr Opin Struct Biol (Band 5), Nr. 1, Seite 114-21. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7773741](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=7773741)
- [2] Renauld, J. C. (2003): Class II cytokine receptors and their ligands: key antiviral and inflammatory modulators, Nat Rev Immunol (Band 3), Nr. 8, Seite 667-76. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12974481](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12974481)
- [3] Dinarello, C. A. (2009): Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family, Annu Rev Immunol (Band 27), Seite 519-50. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19302047](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=19302047)
- [4] Croft, M. (2009): The role of TNF superfamily members in T-cell function and diseases, Nat Rev Immunol (Band 9), Nr. 4, Seite 271-85. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19319144](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=19319144)
- [5] de Caestecker, M. (2004): The transforming growth factor-beta superfamily of receptors, Cytokine Growth Factor Rev (Band 15), Nr. 1, Seite 1-11. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14746809](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=14746809)
- [6] Weaver, C. T.; Hatton, R. D.; Mangan, P. R. und Harrington, L. E. (2007): IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell lineages, Annu Rev Immunol (Band 25), Seite 821-52. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17201677](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=17201677)
- [7] Zlotnik, A. und Yoshie, O. (2000): Chemokines: a new classification system and their role in immunity, Immunity (Band 12), Nr. 2, Seite 121-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10714678](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=10714678)
- [8] Diaz, M. O.; Pomykala, H. M.; Bohlander, S. K.; Maltepe, E.; Malik, K.; Brownstein, B. und Olopade, O. I. (1994): Structure of the human type-I interferon gene cluster determined from a YAC clone contig, Genomics (Band 22), Nr. 3, Seite 540-52. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8001965](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=8001965)
- [9] Gray, P. W. und Goeddel, D. V. (1983): Human immune interferon (IFN-gamma) gene sequence and structure, Basic Life Sci (Band 25), Seite 35-61. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6305337](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=6305337)
- [10] Kotenko, S. V. (2002): The family of IL-10-related cytokines and their receptors: related, but to what extent? Cytokine Growth Factor Rev (Band 13), Nr. 3, Seite 223-40. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12486876](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12486876)
- [11] Chang, C.; Magracheva, E.; Kozlov, S.; Fong, S.; Tobin, G.; Kotenko, S.; Wlodawer, A. und Zdanov, A. (2003): Crystal structure of interleukin-19 defines a new subfamily of helical cytokines, J Biol Chem (Band 278), Nr. 5, Seite 3308-13. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12403790](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12403790)
- [12] Hor, S.; Pirzer, H.; Dumoutier, L.; Bauer, F.; Wittmann, S.; Sticht, H.; Renauld, J. C.; de Waal Malefyt, R. und Fickenscher, H. (2004): The T-cell lymphokine interleukin-26 targets epithelial cells through the interleukin-20 receptor 1 and interleukin-10 receptor 2 chains, J Biol Chem (Band 279), Nr. 32, Seite 33343-51. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15178681](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15178681)
- [13] Langer, J. A.; Rashidbaigi, A.; Garotta, G. und Kempner, E. (1994): Radiation inactivation of human gamma-interferon: cellular activation requires two dimers, Proc Natl Acad Sci U S A (Band 91), Nr. 13, Seite 5818-22. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8016072](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=8016072)
- [14] Nagem, R. A.; Colau, D.; Dumoutier, L.; Renauld, J. C.; Ogata, C. und Polikarpov, I. (2002): Crystal structure of recombinant human interleukin-22, Structure (Camb) (Band 10), Nr. 8, Seite 1051-62. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12176383](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12176383)
- [15] Pestka, S.; Kelder, B.; Familletti, P. C.; Moschera, J. A.; Crawl, R. und Kempner, E. S. (1983): Molecular weight of the functional unit of human leukocyte, fibroblast, and immune interferons, J Biol Chem (Band 258), Nr. 16, Seite 9706-9. URL:



- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=6885765](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=6885765)
- [16] Pletnev, S.; Magracheva, E.; Kozlov, S.; Tobin, G.; Kotenko, S. V.; Wlodawer, A. und Zdanov, A. (2003): Characterization of the recombinant extracellular domains of human interleukin-20 receptors and their complexes with interleukin-19 and interleukin-20, *Biochemistry* (Band 42), Nr. 43, Seite 12617-24. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14580208](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=14580208)
- [17] Donnelly, R. P.; Sheikh, F.; Kotenko, S. V. und Dickensheets, H. (2004): The expanded family of class II cytokines that share the IL-10 receptor-2 (IL-10R2) chain, *J Leukoc Biol* (Band 76), Nr. 2, Seite 314-21. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15123776](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15123776)
- [18] Dumoutier, L.; Leemans, C.; Lejeune, D.; Kotenko, S. V. und Renauld, J. C. (2001): Cutting edge: STAT activation by IL-19, IL-20 and mda-7 through IL-20 receptor complexes of two types, *J Immunol* (Band 167), Nr. 7, Seite 3545-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11564763](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11564763)
- [19] Parrish-Novak, J.; Xu, W.; Brender, T.; Yao, L.; Jones, C.; West, J.; Brandt, C.; Jelinek, L.; Madden, K.; McKernan, P. A.; Foster, D. C.; Jaspers, S. und Chandrasekhar, Y. A. (2002): Interleukins 19, 20, and 24 signal through two distinct receptor complexes. Differences in receptor-ligand interactions mediate unique biological functions, *J Biol Chem* (Band 277), Nr. 49, Seite 47517-23. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12351624](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12351624)
- [20] Pestka, S.; Krause, C. D. und Walter, M. R. (2004): Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors, *Immunol Rev* (Band 202), Seite 8-32. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15546383](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15546383)
- [21] Langer, J. A.; Cutrone, E. C. und Kotenko, S. (2004): The Class II cytokine receptor (CRF2) family: overview and patterns of receptor-ligand interactions, *Cytokine Growth Factor Rev* (Band 15), Nr. 1, Seite 33-48. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14746812](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=14746812)
- [22] Josephson, K.; Logsdon, N. J. und Walter, M. R. (2001): Crystal structure of the IL-10/IL-10R1 complex reveals a shared receptor binding site, *Immunity* (Band 15), Nr. 1, Seite 35-46. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11485736](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11485736)
- [23] Li, J.; Tomkinson, K. N.; Tan, X. Y.; Wu, P.; Yan, G.; Spaulding, V.; Deng, B.; Annis-Freeman, B.; Heveron, K.; Zollner, R.; De Zutter, G.; Wright, J. F.; Crawford, T. K.; Liu, W.; Jacobs, K. A.; Wolfman, N. M.; Ling, V.; Pittman, D. D.; Veldman, G. M. und Fouser, L. A. (2004): Temporal associations between interleukin 22 and the extracellular domains of IL-22R and IL-10R2, *Int Immunopharmacol* (Band 4), Nr. 5, Seite 693-708. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15120653](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15120653)
- [24] Logsdon, N. J.; Jones, B. C.; Josephson, K.; Cook, J. und Walter, M. R. (2002): Comparison of interleukin-22 and interleukin-10 soluble receptor complexes, *J Interferon Cytokine Res* (Band 22), Nr. 11, Seite 1099-112. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12513909](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12513909)
- [25] Reineke, U.; Schneider-Mergener, J.; Glaser, R. W.; Stigler, R. D.; Seifert, M.; Volk, H. D. und Sabat, R. (1999): Evidence for conformationally different states of interleukin-10: binding of a neutralizing antibody enhances accessibility of a hidden epitope, *J Mol Recognit* (Band 12), Nr. 4, Seite 242-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10440995](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=10440995)
- [26] Walter, M. R. (2002): Structure of interleukin-10/interleukin-10R1 complex: a paradigm for class 2 cytokine activation, *Immunol Res* (Band 26), Nr. 1-3, Seite 303-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12403368](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12403368)
- [27] Wolk, K.; Witte, E.; Reineke, U.; Witte, K.; Friedrich, M.; Sterry, W.; Asadullah, K.; Volk, H. D. und Sabat, R. (2005): Is there an interaction between interleukin-10 and interleukin-22? *Genes Immun* (Band 6), Nr. 1, Seite 8-18. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15526001](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15526001)
- [28] Isaacs, A. und Lindenmann, J. (1957): Virus interference. I. The interferon, *Proc R Soc Lond B Biol Sci* (Band 147), Nr. 927, Seite 258-67. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=13465720](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=13465720)
- [29] Malmgaard, L. (2004): Induction and regulation of IFNs during viral infections, *J Interferon Cytokine Res* (Band 24), Nr. 8, Seite 439-54. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15320958](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15320958)
- [30] Schroder, K.; Hertzog, P. J.; Ravasi, T. und Hume, D. A. (2004): Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions, *J Leukoc Biol* (Band 75), Nr. 2, Seite 163-89. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14525967](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=14525967)
- [31] Biron, C. A. (2001): Interferons alpha and beta as immune regulators--a new look, *Immunity* (Band 14), Nr. 6, Seite 661-4. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11420036](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11420036)
- [32] Pestka, S. (1997): The interferon receptors, *Semin Oncol* (Band 24), Nr. 3 Suppl 9, Seite S9-18-S9-40. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9208871](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=9208871)
- [33] Brierley, M. M. und Fish, E. N. (2002): Review: IFN-alpha/beta receptor interactions to biologic outcomes: understanding the circuitry, *J Interferon Cytokine Res* (Band 22), Nr. 8, Seite 835-45. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12396722](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12396722)
- [34] Hewitt, E. W. (2003): The MHC class I antigen presentation pathway: strategies for viral immune evasion, *Immunology* (Band 110), Nr. 2, Seite 163-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14511229](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=14511229)
- [35] Fiorentino, D. F.; Bond, M. W. und Mosmann, T. R. (1989): Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones, *J Exp Med* (Band 170), Nr. 6, Seite 2081-95. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2531194](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=2531194)
- [36] Vieira, P.; de Waal-Malefyt, R.; Dang, M. N.; Johnson, K. E.; Kastelein, R.; Fiorentino, D. F.; deVries, J. E.; Roncarolo, M. G.; Mosmann, T. R. und Moore, K. W. (1991): Isolation and expression of human cytokine synthesis inhibitory factor cDNA clones: homology to Epstein-Barr virus open reading frame BCRF1, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 88), Nr. 4, Seite 1172-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1847510](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=1847510)

- [37] de Waal Malefyt, R.; Abrams, J.; Bennett, B.; Figdor, C. G. und de Vries, J. E. (1991): Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes, J Exp Med (Band 174), Nr. 5, Seite 1209-20. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1940799](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=1940799)
- [38] Fiorentino, D. F.; Zlotnik, A.; Mosmann, T. R.; Howard, M. und O'Garra, A. (1991): IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages, J Immunol (Band 147), Nr. 11, Seite 3815-22. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1940369](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=1940369)
- [39] Gerosa, F.; Baldani-Guerra, B.; Lyakh, L. A.; Batoni, G.; Esin, S.; Winkler-Pickett, R. T.; Consolaro, M. R.; De Marchi, M.; Giachino, D.; Robbiano, A.; Astegiano, M.; Sambataro, A.; Kastelein, R. A.; Carra, G. und Trinchieri, G. (2008): Differential regulation of interleukin 12 and interleukin 23 production in human dendritic cells, J Exp Med (Band 205), Nr. 6, Seite 1447-61. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18490488](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=18490488)
- [40] Hart, P. H.; Hunt, E. K.; Bonder, C. S.; Watson, C. J. und Finlay-Jones, J. J. (1996): Regulation of surface and soluble TNF receptor expression on human monocytes and synovial fluid macrophages by IL-4 and IL-10, J Immunol (Band 157), Nr. 8, Seite 3672-80. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8871669](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=8871669)
- [41] Jenkins, J. K.; Malyak, M. und Arend, W. P. (1994): The effects of interleukin-10 on interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-1 beta production in human monocytes and neutrophils, Lymphokine Cytokine Res (Band 13), Nr. 1, Seite 47-54. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8186324](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=8186324)
- [42] Nurieva, R.; Yang, X. O.; Martinez, G.; Zhang, Y.; Panopoulos, A. D.; Ma, L.; Schluns, K.; Tian, Q.; Watowich, S. S.; Jetten, A. M. und Dong, C. (2007): Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells, Nature (Band 448), Nr. 7152, Seite 480-3. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17581589](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=17581589)

- [43] Allavena, P.; Piemonti, L.; Longoni, D.; Bernasconi, S.; Stoppacciaro, A.; Ruco, L. und Mantovani, A. (1997): IL-10 prevents the generation of dendritic cells from CD14+ blood monocytes, promotes the differentiation to mature macrophages and stimulates endocytosis of FITC-dextran, *Adv Exp Med Biol* (Band 417), Seite 323-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9286381](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=9286381)
- [44] de Waal Malefyt, R.; Haanen, J.; Spits, H.; Roncarolo, M. G.; te Velde, A.; Figdor, C.; Johnson, K.; Kastelein, R.; Yssel, H. und de Vries, J. E. (1991): Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression, *J Exp Med* (Band 174), Nr. 4, Seite 915-24. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1655948](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=1655948)
- [45] Willems, F.; Marchant, A.; Delville, J. P.; Gerard, C.; Delvaux, A.; Velu, T.; de Boer, M. und Goldman, M. (1994): Interleukin-10 inhibits B7 and intercellular adhesion molecule-1 expression on human monocytes, *Eur J Immunol* (Band 24), Nr. 4, Seite 1007-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7512027](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=7512027)
- [46] Calzada-Wack, J. C.; Frankenberger, M. und Ziegler-Heitbrock, H. W. (1996): Interleukin-10 drives human monocytes to CD16 positive macrophages, *J Inflamm* (Band 46), Nr. 2, Seite 78-85. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8734788](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=8734788)
- [47] Sandanger, O.; Ryan, L.; Bohnhorst, J.; Iversen, A. C.; Husebye, H.; Halaas, O.; Landro, L.; Aukrust, P.; Froland, S. S.; Elson, G.; Visintin, A.; Oktedalen, O.; Damas, J. K.; Sundan, A.; Golenbock, D. und Espevik, T. (2009): IL-10 enhances MD-2 and CD14 expression in monocytes and the proteins are increased and correlated in HIV-infected patients, *J Immunol* (Band 182), Nr. 1, Seite 588-95. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19109192](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=19109192)
- [48] Spittler, A.; Schiller, C.; Willheim, M.; Tempfer, C.; Winkler, S. und Boltz-Nitulescu, G. (1995): IL-10 augments CD23 expression on U937 cells and down-regulates IL-4-driven CD23 expression on cultured human blood monocytes: effects of IL-10

- and other cytokines on cell phenotype and phagocytosis, Immunology (Band 85), Nr. 2, Seite 311-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=7642222](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=7642222)
- [49] te Velde, A. A.; de Waal Malefijt, R.; Huijbens, R. J.; de Vries, J. E. und Figdor, C. G. (1992): IL-10 stimulates monocyte Fc gamma R surface expression and cytotoxic activity. Distinct regulation of antibody-dependent cellular cytotoxicity by IFN-gamma, IL-4, and IL-10, J Immunol (Band 149), Nr. 12, Seite 4048-52. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=1460289](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=1460289)
- [50] Asseman, C.; Mauze, S.; Leach, M. W.; Coffman, R. L. und Powrie, F. (1999): An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation, J Exp Med (Band 190), Nr. 7, Seite 995-1004. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=10510089](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=10510089)
- [51] Groux, H.; Bigler, M.; de Vries, J. E. und Roncarolo, M. G. (1996): Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells, J Exp Med (Band 184), Nr. 1, Seite 19-29. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=8691133](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=8691133)
- [52] Groux, H.; O'Garra, A.; Bigler, M.; Rouleau, M.; Antonenko, S.; de Vries, J. E. und Roncarolo, M. G. (1997): A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis, Nature (Band 389), Nr. 6652, Seite 737-42. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=9338786](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=9338786)
- [53] Martin, E.; O'Sullivan, B.; Low, P. und Thomas, R. (2003): Antigen-specific suppression of a primed immune response by dendritic cells mediated by regulatory T cells secreting interleukin-10, Immunity (Band 18), Nr. 1, Seite 155-67. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=12530984](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12530984)
- [54] Gallagher, G.; Dickensheets, H.; Eskdale, J.; Izotova, L. S.; Mirochnitchenko, O. V.; Peat, J. D.; Vazquez, N.; Pestka, S.; Donnelly, R. P. und Kotenko, S. V. (2000): Cloning, expression and initial characterization of interleukin-19 (IL-19), a novel homologue of human interleukin-10 (IL-10), Genes Immun (Band 1), Nr. 7, Seite 442-50. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11196675](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11196675)
- [55] Kunz, S.; Wolk, K.; Witte, E.; Witte, K.; Doecke, W. D.; Volk, H. D.; Sterry, W.; Asadullah, K. und Sabat, R. (2006): Interleukin (IL)-19, IL-20 and IL-24 are produced by and act on keratinocytes and are distinct from classical ILs, *Exp Dermatol* (Band 15), Nr. 12, Seite 991-1004. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17083366](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=17083366)
- [56] Liao, S. C.; Cheng, Y. C.; Wang, Y. C.; Wang, C. W.; Yang, S. M.; Yu, C. K.; Shieh, C. C.; Cheng, K. C.; Lee, M. F.; Chiang, S. R.; Shieh, J. M. und Chang, M. S. (2004): IL-19 induced Th2 cytokines and was up-regulated in asthma patients, *J Immunol* (Band 173), Nr. 11, Seite 6712-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15557163](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15557163)
- [57] Blumberg, H.; Conklin, D.; Xu, W. F.; Grossmann, A.; Brender, T.; Carollo, S.; Eagan, M.; Foster, D.; Haldeman, B. A.; Hammond, A.; Haugen, H.; Jelinek, L.; Kelly, J. D.; Madden, K.; Maurer, M. F.; Parrish-Novak, J.; Prunkard, D.; Sexson, S.; Sprecher, C.; Waggle, K.; West, J.; Whitmore, T. E.; Yao, L.; Kuechle, M. K.; Dale, B. A. und Chandrasekhar, Y. A. (2001): Interleukin 20: discovery, receptor identification, and role in epidermal function, *Cell* (Band 104), Nr. 1, Seite 9-19. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11163236](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11163236)
- [58] Wolk, K.; Kunz, S.; Asadullah, K. und Sabat, R. (2002): Cutting edge: immune cells as sources and targets of the IL-10 family members? *J Immunol* (Band 168), Nr. 11, Seite 5397-402. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12023331](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12023331)
- [59] Wolk, K.; Witte, K.; Witte, E.; Proesch, S.; Schulze-Tanzil, G.; Nasilowska, K.; Thilo, J.; Asadullah, K.; Sterry, W.; Volk, H. D. und Sabat, R. (2008): Maturing dendritic cells are an important source of IL-29 and IL-20 that may cooperatively increase the innate immunity of keratinocytes, *J Leukoc Biol* (Band 83), Nr. 5, Seite 1181-1193. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18281438](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=18281438)
- [60] Sa, S. M.; Valdez, P. A.; Wu, J.; Jung, K.; Zhong, F.; Hall, L.; Kasman, I.; Winer, J.; Modrusan, Z.; Danilenko, D. M. und Ouyang, W. (2007): The effects of IL-20



- subfamily cytokines on reconstituted human epidermis suggest potential roles in cutaneous innate defense and pathogenic adaptive immunity in psoriasis, *J Immunol* (Band 178), Nr. 4, Seite 2229-40. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17277128](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=17277128)
- [61] Stenderup, K.; Rosada, C.; Worsaae, A.; Dagnaes-Hansen, F.; Steiniche, T.; Hasselager, E.; Iversen, L. F.; Zahn, S.; Woldike, H.; Holmberg, H. L.; Romer, J.; Kragballe, K.; Clausen, J. T. und Dam, T. N. (2009): Interleukin-20 plays a critical role in maintenance and development of psoriasis in the human xenograft transplantation model, *Br J Dermatol* (Band 160), Nr. 2, Seite 284-96. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18945296](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18945296)
- [62] Chen, W. Y.; Cheng, B. C.; Jiang, M. J.; Hsieh, M. Y. und Chang, M. S. (2006): IL-20 is expressed in atherosclerosis plaques and promotes atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice, *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (Band 26), Nr. 9, Seite 2090-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16778121](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16778121)
- [63] Hsu, Y. H.; Li, H. H.; Hsieh, M. Y.; Liu, M. F.; Huang, K. Y.; Chin, L. S.; Chen, P. C.; Cheng, H. H. und Chang, M. S. (2006): Function of interleukin-20 as a proinflammatory molecule in rheumatoid and experimental arthritis, *Arthritis Rheum* (Band 54), Nr. 9, Seite 2722-33. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16947773](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16947773)
- [64] Hsieh, M. Y.; Chen, W. Y.; Jiang, M. J.; Cheng, B. C.; Huang, T. Y. und Chang, M. S. (2006): Interleukin-20 promotes angiogenesis in a direct and indirect manner, *Genes Immun* (Band 7), Nr. 3, Seite 234-42. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16511554](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16511554)
- [65] Li, H. H.; Hsu, Y. H.; Wei, C. C.; Lee, P. T.; Chen, W. C. und Chang, M. S. (2008): Interleukin-20 induced cell death in renal epithelial cells and was associated with acute renal failure, *Genes Immun* (Band 9), Nr. 5, Seite 395-404. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18496552](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18496552)
- [66] Tritsaris, K.; Myren, M.; Ditlev, S. B.; Hubschmann, M. V.; van der Blom, I.; Hansen, A. J.; Olsen, U. B.; Cao, R.; Zhang, J.; Jia, T.; Wahlberg, E.; Dissing, S. und Cao, Y. (2007): IL-20 is an arteriogenic cytokine that remodels collateral



- networks and improves functions of ischemic hind limbs, Proc Natl Acad Sci U S A (Band 104), Nr. 39, Seite 15364-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=17878297](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=17878297)
- [67] Wei, C. C.; Li, H. H.; Hsu, Y. H.; Hsing, C. H.; Sung, J. M. und Chang, M. S. (2008): Interleukin-20 targets renal cells and is associated with chronic kidney disease, Biochem Biophys Res Commun (Band 374), Nr. 3, Seite 448-53. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=18639518](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=18639518)
- [68] Dumoutier, L.; Louahed, J. und Renauld, J. C. (2000): Cloning and characterization of IL-10-related T cell-derived inducible factor (IL-TIF), a novel cytokine structurally related to IL-10 and inducible by IL-9, J Immunol (Band 164), Nr. 4, Seite 1814-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=10657629](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=10657629)
- [69] Dumoutier, L.; Van Roost, E.; Colau, D. und Renauld, J. C. (2000): Human interleukin-10-related T cell-derived inducible factor: molecular cloning and functional characterization as an hepatocyte-stimulating factor, Proc Natl Acad Sci U S A (Band 97), Nr. 18, Seite 10144-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=10954742](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=10954742)
- [70] Kotenko, S. V.; Izotova, L. S.; Mirochnitchenko, O. V.; Esterova, E.; Dickensheets, H.; Donnelly, R. P. und Pestka, S. (2001): Identification of the functional interleukin-22 (IL-22) receptor complex: the IL-10R2 chain (IL-10Rbeta) is a common chain of both the IL-10 and IL-22 (IL-10-related T cell-derived inducible factor, IL-TIF) receptor complexes, J Biol Chem (Band 276), Nr. 4, Seite 2725-32. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=11035029](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11035029)
- [71] Xie, M. H.; Aggarwal, S.; Ho, W. H.; Foster, J.; Zhang, Z.; Stinson, J.; Wood, W. I.; Goddard, A. D. und Gurney, A. L. (2000): Interleukin (IL)-22, a novel human cytokine that signals through the interferon receptor-related proteins CRF2-4 and IL-22R, J Biol Chem (Band 275), Nr. 40, Seite 31335-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=10875937](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=10875937)
- [72] Jiang, H.; Lin, J. J.; Su, Z. Z.; Goldstein, N. I. und Fisher, P. B. (1995): Subtraction hybridization identifies a novel melanoma differentiation associated gene, mda-7,

- modulated during human melanoma differentiation, growth and progression, *Oncogene* (Band 11), Nr. 12, Seite 2477-86. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=8545104](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=8545104)
- [73] Schaefer, G.; Venkataraman, C. und Schindler, U. (2001): Cutting edge: FISP (IL-4-induced secreted protein), a novel cytokine-like molecule secreted by Th2 cells, *J Immunol* (Band 166), Nr. 10, Seite 5859-63. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=11342597](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11342597)
- [74] Soo, C.; Shaw, W. W.; Freymiller, E.; Longaker, M. T.; Bertolami, C. N.; Chiu, R.; Tieu, A. und Ting, K. (1999): Cutaneous rat wounds express c49a, a novel gene with homology to the human melanoma differentiation associated gene, mda-7, *J Cell Biochem* (Band 74), Nr. 1, Seite 1-10. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=10381256](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=10381256)
- [75] Zhang, R.; Tan, Z. und Liang, P. (2000): Identification of a novel ligand-receptor pair constitutively activated by ras oncogenes, *J Biol Chem* (Band 275), Nr. 32, Seite 24436-43. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=10825166](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=10825166)
- [76] Huang, E. Y.; Madireddi, M. T.; Gopalkrishnan, R. V.; Leszczyniecka, M.; Su, Z.; Lebedeva, I. V.; Kang, D.; Jiang, H.; Lin, J. J.; Alexandre, D.; Chen, Y.; Vozhilla, N.; Mei, M. X.; Christiansen, K. A.; Sivo, F.; Goldstein, N. I.; Mhashilkar, A. B.; Chada, S.; Huberman, E.; Pestka, S. und Fisher, P. B. (2001): Genomic structure, chromosomal localization and expression profile of a novel melanoma differentiation associated (mda-7) gene with cancer specific growth suppressing and apoptosis inducing properties, *Oncogene* (Band 20), Nr. 48, Seite 7051-63. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=11704829](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11704829)
- [77] Jiang, H.; Su, Z. Z.; Lin, J. J.; Goldstein, N. I.; Young, C. S. und Fisher, P. B. (1996): The melanoma differentiation associated gene mda-7 suppresses cancer cell growth, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 93), Nr. 17, Seite 9160-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=8799171](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=8799171)
- [78] Sauane, M.; Su, Z. Z.; Gupta, P.; Lebedeva, I. V.; Dent, P.; Sarkar, D. und Fisher, P. B. (2008): Autocrine regulation of mda-7/IL-24 mediates cancer-specific

- apoptosis, Proc Natl Acad Sci U S A (Band 105), Nr. 28, Seite 9763-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=18599461](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=18599461)
- [79] Eager, R.; Harle, L. und Nemunaitis, J. (2008): Ad-MDA-7; INGN 241: a review of preclinical and clinical experience, Expert Opin Biol Ther (Band 8), Nr. 10, Seite 1633-43. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=18774929](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=18774929)
- [80] Knappe, A.; Hor, S.; Wittmann, S. und Fickenscher, H. (2000): Induction of a novel cellular homolog of interleukin-10, AK155, by transformation of T lymphocytes with herpesvirus saimiri, J Virol (Band 74), Nr. 8, Seite 3881-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=10729163](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=10729163)
- [81] Wilson, N. J.; Boniface, K.; Chan, J. R.; McKenzie, B. S.; Blumenschein, W. M.; Mattson, J. D.; Basham, B.; Smith, K.; Chen, T.; Morel, F.; Lecron, J. C.; Kastelein, R. A.; Cua, D. J.; McClanahan, T. K.; Bowman, E. P. und de Waal Malefyt, R. (2007): Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells, Nat Immunol (Band 8), Nr. 9, Seite 950-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=17676044](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=17676044)
- [82] Sheikh, F.; Baurin, V. V.; Lewis-Antes, A.; Shah, N. K.; Smirnov, S. V.; Anantha, S.; Dickensheets, H.; Dumoutier, L.; Renauld, J. C.; Zdanov, A.; Donnelly, R. P. und Kotenko, S. V. (2004): Cutting edge: IL-26 signals through a novel receptor complex composed of IL-20 receptor 1 and IL-10 receptor 2, J Immunol (Band 172), Nr. 4, Seite 2006-10. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=14764663](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=14764663)
- [83] Dambacher, J.; Beigel, F.; Zitzmann, K.; De Toni, E. N.; Goke, B.; Diepolder, H. M.; Auernhammer, C. J. und Brand, S. (2009): The role of the novel Th17 cytokine IL-26 in intestinal inflammation, Gut (Band 58), Nr. 9, Seite 1207-17. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=18483078](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=18483078)
- [84] Kotenko, S. V.; Gallagher, G.; Baurin, V. V.; Lewis-Antes, A.; Shen, M.; Shah, N. K.; Langer, J. A.; Sheikh, F.; Dickensheets, H. und Donnelly, R. P. (2003): IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex, Nat Immunol (Band 4), Nr. 1, Seite 69-77. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12483210](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12483210)
- [85] Sheppard, P.; Kindsvogel, W.; Xu, W.; Henderson, K.; Schlutsmeyer, S.; Whitmore, T. E.; Kuestner, R.; Garrigues, U.; Birks, C.; Roraback, J.; Ostrander, C.; Dong, D.; Shin, J.; Presnell, S.; Fox, B.; Haldeman, B.; Cooper, E.; Taft, D.; Gilbert, T.; Grant, F. J.; Tackett, M.; Krivan, W.; McKnight, G.; Clegg, C.; Foster, D. und Klucher, K. M. (2003): IL-28, IL-29 and their class II cytokine receptor IL-28R, *Nat Immunol* (Band 4), Nr. 1, Seite 63-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12469119](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12469119)
- [86] Bartlett, N. W.; Buttigieg, K.; Kotenko, S. V. und Smith, G. L. (2005): Murine interferon lambdas (type III interferons) exhibit potent antiviral activity in vivo in a poxvirus infection model, *J Gen Virol* (Band 86), Nr. Pt 6, Seite 1589-96. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15914836](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15914836)
- [87] Coccia, E. M.; Severa, M.; Giacomini, E.; Monneron, D.; Remoli, M. E.; Julkunen, I.; Cella, M.; Lande, R. und Uze, G. (2004): Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells, *Eur J Immunol* (Band 34), Nr. 3, Seite 796-805. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=14991609](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=14991609)
- [88] Uze, G. und Monneron, D. (2007): IL-28 and IL-29: newcomers to the interferon family, *Biochimie* (Band 89), Nr. 6-7, Seite 729-34. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17367910](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=17367910)
- [89] Brand, S.; Beigel, F.; Olszak, T.; Zitzmann, K.; Eichhorst, S. T.; Otte, J. M.; Diebold, J.; Diepolder, H.; Adler, B.; Auernhammer, C. J.; Goke, B. und Dambacher, J. (2005): IL-28A and IL-29 mediate antiproliferative and antiviral signals in intestinal epithelial cells and murine CMV infection increases colonic IL-28A expression, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (Band 289), Nr. 5, Seite G960-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16051921](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16051921)
- [90] Dumoutier, L.; Tounsi, A.; Michiels, T.; Sommereyns, C.; Kotenko, S. V. und Renauld, J. C. (2004): Role of the interleukin (IL)-28 receptor tyrosine residues for antiviral and antiproliferative activity of IL-29/interferon-lambda 1: similarities with

- type I interferon signaling, J Biol Chem (Band 279), Nr. 31, Seite 32269-74. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=15166220](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15166220)
- [91] Meager, A.; Visvalingam, K.; Dilger, P.; Bryan, D. und Wadhwa, M. (2005): Biological activity of interleukins-28 and -29: comparison with type I interferons, Cytokine (Band 31), Nr. 2, Seite 109-18. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=15899585](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15899585)
- [92] Dumoutier, L.; Van Roost, E.; Ameye, G.; Michaux, L. und Renauld, J. C. (2000): IL-TIF/IL-22: genomic organization and mapping of the human and mouse genes, Genes Immun (Band 1), Nr. 8, Seite 488-94. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=11197690](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11197690)
- [93] Nagem, R. A.; Ferreira Junior, J. R.; Dumoutier, L.; Renauld, J. C. und Polikarpov, I. (2006): Interleukin-22 and its crystal structure, Vitam Horm (Band 74), Seite 77-103. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=17027512](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=17027512)
- [94] Xu, T.; Logsdon, N. J. und Walter, M. R. (2005): Structure of insect-cell-derived IL-22, Acta Crystallogr D Biol Crystallogr (Band 61), Nr. Pt 7, Seite 942-50. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=15983417](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15983417)
- [95] de Oliveira Neto, M.; Ferreira, J. R., Jr.; Colau, D.; Fischer, H.; Nascimento, A. S.; Craievich, A. F.; Dumoutier, L.; Renauld, J. C. und Polikarpov, I. (2008): Interleukin-22 forms dimers that are recognized by two interleukin-22R1 receptor chains, Biophys J (Band 94), Nr. 5, Seite 1754-65. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=18024507](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=18024507)
- [96] Logsdon, N. J.; Jones, B. C.; Allman, J. C.; Izotova, L.; Schwartz, B.; Pestka, S. und Walter, M. R. (2004): The IL-10R2 binding hot spot on IL-22 is located on the N-terminal helix and is dependent on N-linked glycosylation, J Mol Biol (Band 342), Nr. 2, Seite 503-14. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=15327950](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15327950)
- [97] Liang, S. C.; Tan, X. Y.; Luxenberg, D. P.; Karim, R.; Dunussi-Joannopoulos, K.; Collins, M. und Fouser, L. A. (2006): Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides, J

- Exp Med (Band 203), Nr. 10, Seite 2271-9. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16982811](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16982811)
- [98] Korn, T.; Bettelli, E.; Oukka, M. und Kuchroo, V. K. (2009): IL-17 and Th17 Cells, Annu Rev Immunol (Band 27), Seite 485-517. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19132915](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=19132915)
- [99] Chung, Y.; Yang, X.; Chang, S. H.; Ma, L.; Tian, Q. und Dong, C. (2006): Expression and regulation of IL-22 in the IL-17-producing CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, Cell Res (Band 16), Nr. 11, Seite 902-7. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17088898](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=17088898)
- [100] Zheng, Y.; Danilenko, D. M.; Valdez, P.; Kasman, I.; Eastham-Anderson, J.; Wu, J. und Ouyang, W. (2007): Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis, Nature (Band 445), Nr. 7128, Seite 648-51. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17187052](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=17187052)
- [101] Volpe, E.; Servant, N.; Zollinger, R.; Bogiatzi, S. I.; Hupe, P.; Barillot, E. und Soumelis, V. (2008): A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses, Nat Immunol (Band 9), Nr. 6, Seite 650-7. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18454150](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=18454150)
- [102] Duhon, T.; Geiger, R.; Jarrossay, D.; Lanzavecchia, A. und Sallusto, F. (2009): Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells, Nat Immunol (Band 10), Nr. 8, Seite 857-63. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19578369](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=19578369)
- [103] Eyerich, S.; Eyerich, K.; Pennino, D.; Carbone, T.; Nasorri, F.; Pallotta, S.; Cianfarani, F.; Odorisio, T.; Traidl-Hoffmann, C.; Behrendt, H.; Durham, S. R.; Schmidt-Weber, C. B. und Cavani, A. (2009): Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling, J Clin Invest. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19920355](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=19920355)

- [104] Trifari, S.; Kaplan, C. D.; Tran, E. H.; Crellin, N. K. und Spits, H. (2009): Identification of a human helper T cell population that has abundant production of interleukin 22 and is distinct from T(H)-17, T(H)1 and T(H)2 cells, *Nat Immunol* (Band 10), Nr. 8, Seite 864-71. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19578368](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19578368)
- [105] Martin, B.; Hirota, K.; Cua, D. J.; Stockinger, B. und Veldhoen, M. (2009): Interleukin-17-producing gammadelta T cells selectively expand in response to pathogen products and environmental signals, *Immunity* (Band 31), Nr. 2, Seite 321-30. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19682928](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19682928)
- [106] Sutton, C. E.; Lalor, S. J.; Sweeney, C. M.; Brereton, C. F.; Lavelle, E. C. und Mills, K. H. (2009): Interleukin-1 and IL-23 induce innate IL-17 production from gammadelta T cells, amplifying Th17 responses and autoimmunity, *Immunity* (Band 31), Nr. 2, Seite 331-41. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19682929](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19682929)
- [107] Cella, M.; Fuchs, A.; Vermi, W.; Facchetti, F.; Otero, K.; Lennerz, J. K.; Doherty, J. M.; Mills, J. C. und Colonna, M. (2009): A human natural killer cell subset provides an innate source of IL-22 for mucosal immunity, *Nature* (Band 457), Nr. 7230, Seite 722-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18978771](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18978771)
- [108] Goto, M.; Murakawa, M.; Kadoshima-Yamaoka, K.; Tanaka, Y.; Nagahira, K.; Fukuda, Y. und Nishimura, T. (2009): Murine NKT cells produce Th17 cytokine interleukin-22, *Cell Immunol* (Band 254), Nr. 2, Seite 81-4. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19010461](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19010461)
- [109] Wolk, K.; Kunz, S.; Witte, E.; Friedrich, M.; Asadullah, K. und Sabat, R. (2004): IL-22 increases the innate immunity of tissues, *Immunity* (Band 21), Nr. 2, Seite 241-54. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15308104](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15308104)
- [110] Wolk, K.; Witte, E.; Wallace, E.; Docke, W. D.; Kunz, S.; Asadullah, K.; Volk, H. D.; Sterry, W. und Sabat, R. (2006): IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in



- keratinocytes: a potential role in psoriasis, Eur J Immunol (Band 36), Nr. 5, Seite 1309-23. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=16619290](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16619290)
- [111] Aujla, S. J.; Chan, Y. R.; Zheng, M.; Fei, M.; Askew, D. J.; Pociask, D. A.; Reinhart, T. A.; McAllister, F.; Edeal, J.; Gaus, K.; Husain, S.; Kreindler, J. L.; Dubin, P. J.; Pilewski, J. M.; Myerburg, M. M.; Mason, C. A.; Iwakura, Y. und Kolls, J. K. (2008): IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia, Nat Med (Band 14), Nr. 3, Seite 275-81. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=18264110](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=18264110)
- [112] Weber, G. F.; Schlautkotter, S.; Kaiser-Moore, S.; Altmayr, F.; Holzmann, B. und Weighardt, H. (2007): Inhibition of interleukin-22 attenuates bacterial load and organ failure during acute polymicrobial sepsis, Infect Immun (Band 75), Nr. 4, Seite 1690-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=17261606](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=17261606)
- [113] Scriba, T. J.; Kalsdorf, B.; Abrahams, D. A.; Isaacs, F.; Hofmeister, J.; Black, G.; Hassan, H. Y.; Wilkinson, R. J.; Walzl, G.; Gelderbloem, S. J.; Mahomed, H.; Hussey, G. D. und Hanekom, W. A. (2008): Distinct, specific IL-17- and IL-22-producing CD4+ T cell subsets contribute to the human anti-mycobacterial immune response, J Immunol (Band 180), Nr. 3, Seite 1962-70. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=18209095](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=18209095)
- [114] Boniface, K.; Guignouard, E.; Pedretti, N.; Garcia, M.; Delwail, A.; Bernard, F. X.; Nau, F.; Guillet, G.; Dagregorio, G.; Yssel, H.; Lecron, J. C. und Morel, F. (2007): A role for T cell-derived interleukin 22 in psoriatic skin inflammation, Clin Exp Immunol (Band 150), Nr. 3, Seite 407-15. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=17900301](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=17900301)
- [115] Ma, H. L.; Liang, S.; Li, J.; Napierata, L.; Brown, T.; Benoit, S.; Senices, M.; Gill, D.; Dunussi-Joannopoulos, K.; Collins, M.; Nickerson-Nutter, C.; Fouser, L. A. und Young, D. A. (2008): IL-22 is required for Th17 cell-mediated pathology in a mouse model of psoriasis-like skin inflammation, J Clin Invest (Band 118), Nr. 2, Seite 597-607. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=18202747](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=18202747)



- [116] Andoh, A.; Zhang, Z.; Inatomi, O.; Fujino, S.; Deguchi, Y.; Araki, Y.; Tsujikawa, T.; Kitoh, K.; Kim-Mitsuyama, S.; Takayanagi, A.; Shimizu, N. und Fujiyama, Y. (2005): Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts, *Gastroenterology* (Band 129), Nr. 3, Seite 969-84. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16143135](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16143135)
- [117] Brand, S.; Beigel, F.; Olszak, T.; Zitzmann, K.; Eichhorst, S. T.; Otte, J. M.; Diepolder, H.; Marquardt, A.; Jagla, W.; Popp, A.; Leclair, S.; Herrmann, K.; Seiderer, J.; Ochsenkuhn, T.; Goke, B.; Auernhammer, C. J. und Dambacher, J. (2006): IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (Band 290), Nr. 4, Seite G827-38. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16537974](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16537974)
- [118] Sugimoto, K.; Ogawa, A.; Mizoguchi, E.; Shimomura, Y.; Andoh, A.; Bhan, A. K.; Blumberg, R. S.; Xavier, R. J. und Mizoguchi, A. (2008): IL-22 ameliorates intestinal inflammation in a mouse model of ulcerative colitis, *J Clin Invest* (Band 118), Nr. 2, Seite 534-44. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18172556](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=18172556)
- [119] Brand, S.; Dambacher, J.; Beigel, F.; Zitzmann, K.; Heeg, M. H.; Weiss, T. S.; Prufer, T.; Olszak, T.; Steib, C. J.; Storr, M.; Goke, B.; Diepolder, H.; Bilzer, M.; Thasler, W. E. und Auernhammer, C. J. (2007): IL-22 mediated liver cell regeneration is abrogated by SOCS-1/3 overexpression in vitro, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17204547](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=17204547)
- [120] Radaeva, S.; Sun, R.; Pan, H. N.; Hong, F. und Gao, B. (2004): Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis: IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation, *Hepatology* (Band 39), Nr. 5, Seite 1332-42. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15122762](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15122762)
- [121] Zenewicz, L. A.; Yancopoulos, G. D.; Valenzuela, D. M.; Murphy, A. J.; Karow, M. und Flavell, R. A. (2007): Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation, *Immunity* (Band 27), Nr. 4, Seite

- 647-59. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=17919941](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=17919941)
- [122] Chang, H.; Hanawa, H.; Liu, H.; Yoshida, T.; Hayashi, M.; Watanabe, R.; Abe, S.; Toba, K.; Yoshida, K.; Elnaggar, R.; Minagawa, S.; Okura, Y.; Kato, K.; Kodama, M.; Maruyama, H.; Miyazaki, J. und Aizawa, Y. (2006): Hydrodynamic-based delivery of an interleukin-22-Ig fusion gene ameliorates experimental autoimmune myocarditis in rats, *J Immunol* (Band 177), Nr. 6, Seite 3635-43. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=16951323](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16951323)
- [123] Ikeuchi, H.; Kuroiwa, T.; Hiramatsu, N.; Kaneko, Y.; Hiromura, K.; Ueki, K. und Nojima, Y. (2005): Expression of interleukin-22 in rheumatoid arthritis: potential role as a proinflammatory cytokine, *Arthritis Rheum* (Band 52), Nr. 4, Seite 1037-46. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=15818686](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15818686)
- [124] Kebir, H.; Kreymborg, K.; Ifergan, I.; Dodelet-Devillers, A.; Cayrol, R.; Bernard, M.; Giuliani, F.; Arbour, N.; Becher, B. und Prat, A. (2007): Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation, *Nat Med* (Band 13), Nr. 10, Seite 1173-5. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=17828272](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=17828272)
- [125] Kreymborg, K.; Etzensperger, R.; Dumoutier, L.; Haak, S.; Rebollo, A.; Buch, T.; Heppner, F. L.; Renauld, J. C. und Becher, B. (2007): IL-22 is expressed by Th17 cells in an IL-23-dependent fashion, but not required for the development of autoimmune encephalomyelitis, *J Immunol* (Band 179), Nr. 12, Seite 8098-104. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=18056351](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=18056351)
- [126] Whittington, H. A.; Armstrong, L.; Uppington, K. M. und Millar, A. B. (2004): Interleukin-22: a potential immunomodulatory molecule in the lung, *Am J Respir Cell Mol Biol* (Band 31), Nr. 2, Seite 220-6. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=15039135](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15039135)
- [127] Jones, B. C.; Logsdon, N. J. und Walter, M. R. (2008): Structure of IL-22 bound to its high-affinity IL-22R1 chain, *Structure* (Band 16), Nr. 9, Seite 1333-44. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18599299](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=18599299)
- [128] Yoon, S. I.; Logsdon, N. J.; Sheikh, F.; Donnelly, R. P. und Walter, M. R. (2006): Conformational changes mediate interleukin-10 receptor 2 (IL-10R2) binding to IL-10 and assembly of the signaling complex, J Biol Chem (Band 281), Nr. 46, Seite 35088-96. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16982608](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16982608)
- [129] Kotenko, S. V.; Krause, C. D.; Izotova, L. S.; Pollack, B. P.; Wu, W. und Pestka, S. (1997): Identification and functional characterization of a second chain of the interleukin-10 receptor complex, Embo J (Band 16), Nr. 19, Seite 5894-903. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9312047](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=9312047)
- [130] Lejeune, D.; Dumoutier, L.; Constantinescu, S.; Kruijer, W.; Schuringa, J. J. und Renauld, J. C. (2002): Interleukin-22 (IL-22) activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP kinase pathways in a rat hepatoma cell line. Pathways that are shared with and distinct from IL-10, J Biol Chem (Band 277), Nr. 37, Seite 33676-82. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12087100](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12087100)
- [131] Aggarwal, S.; Xie, M. H.; Maruoka, M.; Foster, J. und Gurney, A. L. (2001): Acinar cells of the pancreas are a target of interleukin-22, J Interferon Cytokine Res (Band 21), Nr. 12, Seite 1047-53. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11798462](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11798462)
- [132] Boniface, K.; Bernard, F. X.; Garcia, M.; Gurney, A. L.; Lecron, J. C. und Morel, F. (2005): IL-22 inhibits epidermal differentiation and induces proinflammatory gene expression and migration of human keratinocytes, J Immunol (Band 174), Nr. 6, Seite 3695-702. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15749908](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15749908)
- [133] Nagalakshmi, M. L.; Rascole, A.; Zurawski, S.; Menon, S. und de Waal Malefyt, R. (2004): Interleukin-22 activates STAT3 and induces IL-10 by colon epithelial cells, Int Immunopharmacol (Band 4), Nr. 5, Seite 679-91. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15120652](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15120652)

- [134] Kalsheker, N. A. (1996): Alpha 1-antichymotrypsin, *Int J Biochem Cell Biol* (Band 28), Nr. 9, Seite 961-4. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=8930118](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=8930118)
- [135] Shah, C.; Hari-Dass, R. und Raynes, J. G. (2006): Serum amyloid A is an innate immune opsonin for Gram-negative bacteria, *Blood* (Band 108), Nr. 5, Seite 1751-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=16735604](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16735604)
- [136] Lim, S. K.; Kim, H.; Lim, S. K.; bin Ali, A.; Lim, Y. K.; Wang, Y.; Chong, S. M.; Costantini, F. und Baumann, H. (1998): Increased susceptibility in Hp knockout mice during acute hemolysis, *Blood* (Band 92), Nr. 6, Seite 1870-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=9731043](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=9731043)
- [137] Schroder, J. M. und Harder, J. (2006): Antimicrobial skin peptides and proteins, *Cell Mol Life Sci* (Band 63), Nr. 4, Seite 469-86. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=16416029](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16416029)
- [138] Heilmann, K.; Hoffmann, U.; Witte, E.; Loddenkemper, C.; Sina, C.; Schreiber, S.; Hayford, C.; Holzlohner, P.; Wolk, K.; Tchatchou, E.; Moos, V.; Zeitz, M.; Sabat, R.; Gunthert, U. und Wittig, B. M. (2008): Osteopontin as two-sided mediator of intestinal inflammation, *J Cell Mol Med*. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=18627421](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=18627421)
- [139] Sodek, J.; Batista Da Silva, A. P. und Zohar, R. (2006): Osteopontin and mucosal protection, *J Dent Res* (Band 85), Nr. 5, Seite 404-15. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=16632752](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16632752)
- [140] Fiedler, F.; Croissant, N.; Rehbein, C.; Iovanna, J. L.; Dagorn, J. C.; van Ackern, K. und Keim, V. (1998): Acute-phase response of the rat pancreas protects against further aggression with severe necrotizing pancreatitis, *Crit Care Med* (Band 26), Nr. 5, Seite 887-94. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=9590319](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=9590319)
- [141] Gironella, M.; Iovanna, J. L.; Sans, M.; Gil, F.; Penalva, M.; Closa, D.; Miquel, R.; Pique, J. M. und Panes, J. (2005): Anti-inflammatory effects of pancreatitis associated protein in inflammatory bowel disease, *Gut* (Band 54), Nr. 9, Seite

- 1244-53. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=15870231](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15870231)
- [142] Heller, A.; Fiedler, F.; Schmeck, J.; Luck, V.; Iovanna, J. L. und Koch, T. (1999): Pancreatitis-associated protein protects the lung from leukocyte-induced injury, *Anesthesiology* (Band 91), Nr. 5, Seite 1408-14. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=10551593](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=10551593)
- [143] Iovanna, J.; Orelle, B.; Keim, V. und Dagorn, J. C. (1991): Messenger RNA sequence and expression of rat pancreatitis-associated protein, a lectin-related protein overexpressed during acute experimental pancreatitis, *J Biol Chem* (Band 266), Nr. 36, Seite 24664-9. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=1722211](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=1722211)
- [144] Zhang, H.; Kandil, E.; Lin, Y. Y.; Levi, G. und Zenilman, M. E. (2004): Targeted inhibition of gene expression of pancreatitis-associated proteins exacerbates the severity of acute pancreatitis in rats, *Scand J Gastroenterol* (Band 39), Nr. 9, Seite 870-81. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=15513386](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15513386)
- [145] Pan, H.; Hong, F.; Radaeva, S. und Gao, B. (2004): Hydrodynamic gene delivery of interleukin-22 protects the mouse liver from concanavalin A-, carbon tetrachloride-, and Fas ligand-induced injury via activation of STAT3, *Cell Mol Immunol* (Band 1), Nr. 1, Seite 43-9. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=16212920](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16212920)
- [146] Weber, G. F.; Gaertner, F. C.; Erl, W.; Janssen, K. P.; Blechert, B.; Holzmann, B.; Weighardt, H. und Essler, M. (2006): IL-22-mediated tumor growth reduction correlates with inhibition of ERK1/2 and AKT phosphorylation and induction of cell cycle arrest in the G2-M phase, *J Immunol* (Band 177), Nr. 11, Seite 8266-72. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=17114505](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=17114505)
- [147] Nagakawa, H.; Shimozato, O.; Yu, L.; Takiguchi, Y.; Tatsumi, K.; Kuriyama, T. und Tagawa, M. (2004): Expression of interleukin-22 in murine carcinoma cells did not influence tumour growth in vivo but did improve survival of the inoculated hosts, *Scand J Immunol* (Band 60), Nr. 5, Seite 449-54. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15541036](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15541036)
- [148] Dumoutier, L.; Lejeune, D.; Colau, D. und Renauld, J. C. (2001): Cloning and characterization of IL-22 binding protein, a natural antagonist of IL-10-related T cell-derived inducible factor/IL-22, J Immunol (Band 166), Nr. 12, Seite 7090-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11390453](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11390453)
- [149] Gruenberg, B. H.; Schoenemeyer, A.; Weiss, B.; Toschi, L.; Kunz, S.; Wolk, K.; Asadullah, K. und Sabat, R. (2001): A novel, soluble homologue of the human IL-10 receptor with preferential expression in placenta, Genes Immun (Band 2), Nr. 6, Seite 329-34. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11607789](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11607789)
- [150] Kotenko, S. V.; Izotova, L. S.; Mirochnitchenko, O. V.; Esterova, E.; Dickensheets, H.; Donnelly, R. P. und Pestka, S. (2001): Identification, cloning, and characterization of a novel soluble receptor that binds IL-22 and neutralizes its activity, J Immunol (Band 166), Nr. 12, Seite 7096-103. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11390454](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11390454)
- [151] Lecart, S.; Morel, F.; Noraz, N.; Pene, J.; Garcia, M.; Boniface, K.; Lecron, J. C. und Yssel, H. (2002): IL-22, in contrast to IL-10, does not induce Ig production, due to absence of a functional IL-22 receptor on activated human B cells, Int Immunol (Band 14), Nr. 11, Seite 1351-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12407026](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12407026)
- [152] Xu, W.; Presnell, S. R.; Parrish-Novak, J.; Kindsvogel, W.; Jaspers, S.; Chen, Z.; Dillon, S. R.; Gao, Z.; Gilbert, T.; Madden, K.; Schlutsmeyer, S.; Yao, L.; Whitmore, T. E.; Chandrasekhar, Y.; Grant, F. J.; Maurer, M.; Jelinek, L.; Storey, H.; Brender, T.; Hammond, A.; Topouzis, S.; Clegg, C. H. und Foster, D. C. (2001): A soluble class II cytokine receptor, IL-22RA2, is a naturally occurring IL-22 antagonist, Proc Natl Acad Sci U S A (Band 98), Nr. 17, Seite 9511-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11481447](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11481447)
- [153] Romagnani, S.; Giudizi, M. G.; Biagiotti, R.; Almerigogna, F.; Maggi, E.; Del Prete, G. und Ricci, M. (1981): Surface immunoglobulins are involved in the interaction of protein A with human B cells and in the triggering of B cell proliferation induced by

- protein A-containing *Staphylococcus aureus*, *J Immunol* (Band 127), Nr. 4, Seite 1307-13. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=6974188](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=6974188)
- [154] Trinchieri, G.; Matsumoto-Kobayashi, M.; Clark, S. C.; Seehra, J.; London, L. und Perussia, B. (1984): Response of resting human peripheral blood natural killer cells to interleukin 2, *J Exp Med* (Band 160), Nr. 4, Seite 1147-69. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=6434688](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=6434688)
- [155] Walker, W.; Aste-Amezaga, M.; Kastelein, R. A.; Trinchieri, G. und Hunter, C. A. (1999): IL-18 and CD28 use distinct molecular mechanisms to enhance NK cell production of IL-12-induced IFN-gamma, *J Immunol* (Band 162), Nr. 10, Seite 5894-901. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=10229825](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=10229825)
- [156] Sabat, R.; Philipp, S.; Hoflich, C.; Kreutzer, S.; Wallace, E.; Asadullah, K.; Volk, H. D.; Sterry, W. und Wolk, K. (2007): Immunopathogenesis of psoriasis, *Exp Dermatol* (Band 16), Nr. 10, Seite 779-98. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=17845210](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=17845210)
- [157] Te Velde, A. A.; de Kort, F.; Sterrenburg, E.; Pronk, I.; Ten Kate, F. J.; Hommes, D. W. und van Deventer, S. J. (2006): Comparative analysis of colonic gene expression of three experimental colitis models mimicking inflammatory bowel disease, *Inflamm Bowel Dis*. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=17206675](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=17206675)
- [158] Alexander, W. S. (2002): Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system, *Nat Rev Immunol* (Band 2), Nr. 6, Seite 410-6. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=12093007](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12093007)
- [159] Lew, W.; Bowcock, A. M. und Krueger, J. G. (2004): Psoriasis vulgaris: cutaneous lymphoid tissue supports T-cell activation and "Type 1" inflammatory gene expression, *Trends Immunol* (Band 25), Nr. 6, Seite 295-305. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=15145319](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15145319)
- [160] Hu, T.; Kao, C. Y.; Hudson, R. T.; Chen, A. und Draper, R. K. (1999): Inhibition of secretion by 1,3-Cyclohexanebis(methylamine), a dibasic compound that interferes



- with coatomer function, Mol Biol Cell (Band 10), Nr. 4, Seite 921-33. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=10198047](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=10198047)
- [161] Obrig, T. G.; Culp, W. J.; McKeehan, W. L. und Hardesty, B. (1971): The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes, J Biol Chem (Band 246), Nr. 1, Seite 174-81. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=5541758](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=5541758)
- [162] Sciaky, N.; Presley, J.; Smith, C.; Zaal, K. J.; Cole, N.; Moreira, J. E.; Terasaki, M.; Siggia, E. und Lippincott-Schwartz, J. (1997): Golgi tubule traffic and the effects of brefeldin A visualized in living cells, J Cell Biol (Band 139), Nr. 5, Seite 1137-55. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9382862](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=9382862)
- [163] Sobell, H. M. (1985): Actinomycin and DNA transcription, Proc Natl Acad Sci U S A (Band 82), Nr. 16, Seite 5328-31. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2410919](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=2410919)
- [164] Tobias, P. S.; Soldau, K. und Ulevitch, R. J. (1986): Isolation of a lipopolysaccharide-binding acute phase reactant from rabbit serum, J Exp Med (Band 164), Nr. 3, Seite 777-93. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2427635](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=2427635)
- [165] Kitchens, R. L. und Thompson, P. A. (2005): Modulatory effects of sCD14 and LBP on LPS-host cell interactions, J Endotoxin Res (Band 11), Nr. 4, Seite 225-9. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16176659](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16176659)
- [166] Grube, B. J.; Cochane, C. G.; Ye, R. D.; Green, C. E.; McPhail, M. E.; Ulevitch, R. J. und Tobias, P. S. (1994): Lipopolysaccharide binding protein expression in primary human hepatocytes and HepG2 hepatoma cells, J Biol Chem (Band 269), Nr. 11, Seite 8477-82. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7510687](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=7510687)
- [167] Su, G. L.; Freeswick, P. D.; Geller, D. A.; Wang, Q.; Shapiro, R. A.; Wan, Y. H.; Billiar, T. R.; Tweardy, D. J.; Simmons, R. L. und Wang, S. C. (1994): Molecular cloning, characterization, and tissue distribution of rat lipopolysaccharide binding



- protein. Evidence for extrahepatic expression, *J Immunol* (Band 153), Nr. 2, Seite 743-52. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=8021509](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=8021509)
- [168] Wei, C. C.; Ho, T. W.; Liang, W. G.; Chen, G. Y. und Chang, M. S. (2003): Cloning and characterization of mouse IL-22 binding protein, *Genes Immun* (Band 4), Nr. 3, Seite 204-11. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=12700595](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12700595)
- [169] Novick, D.; Schwartsburd, B.; Pinkus, R.; Suissa, D.; Belzer, I.; Sthoeger, Z.; Keane, W. F.; Chvatchko, Y.; Kim, S. H.; Fantuzzi, G.; Dinarello, C. A. und Rubinstein, M. (2001): A novel IL-18BP ELISA shows elevated serum IL-18BP in sepsis and extensive decrease of free IL-18, *Cytokine* (Band 14), Nr. 6, Seite 334-42. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=11497494](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11497494)
- [170] Pene, J.; Chevalier, S.; Preisser, L.; Venereau, E.; Guilleux, M. H.; Ghannam, S.; Moles, J. P.; Danger, Y.; Ravon, E.; Lesaux, S.; Yssel, H. und Gascan, H. (2008): Chronically inflamed human tissues are infiltrated by highly differentiated Th17 lymphocytes, *J Immunol* (Band 180), Nr. 11, Seite 7423-30. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=18490742](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=18490742)
- [171] Christophers, E. (2001): Psoriasis--epidemiology and clinical spectrum, *Clin Exp Dermatol* (Band 26), Nr. 4, Seite 314-20. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=11422182](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11422182)
- [172] Schon, M. P. und Boehncke, W. H. (2005): Psoriasis, *N Engl J Med* (Band 352), Nr. 18, Seite 1899-912. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=15872205](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15872205)
- [173] Capon, F.; Di Meglio, P.; Szaub, J.; Prescott, N. J.; Dunster, C.; Baumber, L.; Timms, K.; Gutin, A.; Abkevic, V.; Burden, A. D.; Lanchbury, J.; Barker, J. N.; Trembath, R. C. und Nestle, F. O. (2007): Sequence variants in the genes for the interleukin-23 receptor (IL23R) and its ligand (IL12B) confer protection against psoriasis, *Hum Genet* (Band 122), Nr. 2, Seite 201-6. URL:  
[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=17587057](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=17587057)

- [174] Cargill, M.; Schrodi, S. J.; Chang, M.; Garcia, V. E.; Brandon, R.; Callis, K. P.; Matsunami, N.; Ardlie, K. G.; Civello, D.; Catanese, J. J.; Leong, D. U.; Panko, J. M.; McAllister, L. B.; Hansen, C. B.; Papenfuss, J.; Prescott, S. M.; White, T. J.; Leppert, M. F.; Krueger, G. G. und Begovich, A. B. (2007): A large-scale genetic association study confirms IL12B and leads to the identification of IL23R as psoriasis-risk genes, *Am J Hum Genet* (Band 80), Nr. 2, Seite 273-90. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=17236132](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=17236132)
- [175] Gudjonsson, J. E.; Thorarinsson, A. M.; Sigurgeirsson, B.; Kristinsson, K. G. und Valdimarsson, H. (2003): Streptococcal throat infections and exacerbation of chronic plaque psoriasis: a prospective study, *Br J Dermatol* (Band 149), Nr. 3, Seite 530-4. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=14510985](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=14510985)
- [176] Eyre, R. W. und Krueger, G. G. (1982): Response to injury of skin involved and uninvolved with psoriasis, and its relation to disease activity: Koebner and 'reverse' Koebner reactions, *Br J Dermatol* (Band 106), Nr. 2, Seite 153-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=7037041](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=7037041)
- [177] Dika, E.; Varotti, C.; Bardazzi, F. und Maibach, H. I. (2006): Drug-induced psoriasis: an evidence-based overview and the introduction of psoriatic drug eruption probability score, *Cutan Ocul Toxicol* (Band 25), Nr. 1, Seite 1-11. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=16702050](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16702050)
- [178] Sabat, R.; Sterry, W.; Philipp, S. und Wolk, K. (2007): Three decades of psoriasis research: where has it led us? *Clin Dermatol* (Band 25), Nr. 6, Seite 504-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=18021885](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=18021885)
- [179] Fuchs, E. (1990): Epidermal differentiation: the bare essentials, *J Cell Biol* (Band 111), Nr. 6 Pt 2, Seite 2807-14. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=2269655](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=2269655)
- [180] Pearton, D. J.; Dale, B. A. und Presland, R. B. (2002): Functional analysis of the profilaggrin N-terminal peptide: identification of domains that regulate nuclear and cytoplasmic distribution, *J Invest Dermatol* (Band 119), Nr. 3, Seite 661-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=12230510](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12230510)

- [181] Porter, R. M.; Leitgeb, S.; Melton, D. W.; Swensson, O.; Eady, R. A. und Magin, T. M. (1996): Gene targeting at the mouse cytokeratin 10 locus: severe skin fragility and changes of cytokeratin expression in the epidermis, *J Cell Biol* (Band 132), Nr. 5, Seite 925-36. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=8603923](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=8603923)
- [182] Mehul, B.; Bernard, D.; Simonetti, L.; Bernard, M. A. und Schmidt, R. (2000): Identification and cloning of a new calmodulin-like protein from human epidermis, *J Biol Chem* (Band 275), Nr. 17, Seite 12841-7. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=10777582](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=10777582)
- [183] Oomizu, S.; Sahuc, F.; Asahina, K.; Inamatsu, M.; Matsuzaki, T.; Sasaki, M.; Obara, M. und Yoshizato, K. (2000): Kdap, a novel gene associated with the stratification of the epithelium, *Gene* (Band 256), Nr. 1-2, Seite 19-27. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=11054531](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11054531)
- [184] Caubet, C.; Jonca, N.; Brattsand, M.; Guerrin, M.; Bernard, D.; Schmidt, R.; Egelrud, T.; Simon, M. und Serre, G. (2004): Degradation of corneodesmosome proteins by two serine proteases of the kallikrein family, SCTE/KLK5/hK5 and SCCE/KLK7/hK7, *J Invest Dermatol* (Band 122), Nr. 5, Seite 1235-44. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=15140227](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15140227)
- [185] Wolk, K.; Haugen, H. S.; Xu, W.; Witte, E.; Waggie, K.; Anderson, M.; Vom Baur, E.; Witte, K.; Warszawska, K.; Philipp, S.; Johnson-Leger, C.; Volk, H. D.; Sterry, W. und Sabat, R. (2009): IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN-gamma are not, *J Mol Med* (Band 87), Nr. 5, Seite 523-36. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=19330474](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=19330474)
- [186] Bullard, K. M.; Lund, L.; Mudgett, J. S.; Mellin, T. N.; Hunt, T. K.; Murphy, B.; Ronan, J.; Werb, Z. und Banda, M. J. (1999): Impaired wound contraction in stromelysin-1-deficient mice, *Ann Surg* (Band 230), Nr. 2, Seite 260-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=10450741](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=10450741)
- [187] Pilcher, B. K.; Dumin, J. A.; Sudbeck, B. D.; Krane, S. M.; Welgus, H. G. und Parks, W. C. (1997): The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix, *J Cell Biol* (Band 137), Nr. 6, Seite 1445-57.

URL:

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=9182674](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=9182674)

- [188] Li, C. K.; Pender, S. L.; Pickard, K. M.; Chance, V.; Holloway, J. A.; Huett, A.; Goncalves, N. S.; Mudgett, J. S.; Dougan, G.; Frankel, G. und MacDonald, T. T. (2004): Impaired immunity to intestinal bacterial infection in stromelysin-1 (matrix metalloproteinase-3)-deficient mice, *J Immunol* (Band 173), Nr. 8, Seite 5171-9. URL:

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=15470062](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15470062)

- [189] Goebeler, V.; Ruhe, D.; Gerke, V. und Rescher, U. (2003): Atypical properties displayed by annexin A9, a novel member of the annexin family of Ca(2+) and lipid binding proteins, *FEBS Lett* (Band 546), Nr. 2-3, Seite 359-64. URL:

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=12832069](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12832069)

- [190] Hayes, M. J.; Rescher, U.; Gerke, V. und Moss, S. E. (2004): Annexin-actin interactions, *Traffic* (Band 5), Nr. 8, Seite 571-6. URL:

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=15260827](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15260827)

- [191] Glaser, R.; Harder, J.; Lange, H.; Bartels, J.; Christophers, E. und Schroder, J. M. (2005): Antimicrobial psoriasin (S100A7) protects human skin from *Escherichia coli* infection, *Nat Immunol* (Band 6), Nr. 1, Seite 57-64. URL:

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=15568027](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15568027)

- [192] Murthy, A. R.; Lehrer, R. I.; Harwig, S. S. und Miyasaki, K. T. (1993): In vitro candidastatic properties of the human neutrophil calprotectin complex, *J Immunol* (Band 151), Nr. 11, Seite 6291-301. URL:

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=8245468](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=8245468)

- [193] Lusitani, D.; Malawista, S. E. und Montgomery, R. R. (2003): Calprotectin, an abundant cytosolic protein from human polymorphonuclear leukocytes, inhibits the growth of *Borrelia burgdorferi*, *Infect Immun* (Band 71), Nr. 8, Seite 4711-6. URL:

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=12874352](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12874352)

- [194] Sohnle, P. G.; Collins-Lech, C. und Wiessner, J. H. (1991): Antimicrobial activity of an abundant calcium-binding protein in the cytoplasm of human neutrophils, *J Infect Dis* (Band 163), Nr. 1, Seite 187-92. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=1984467](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=1984467)
- [195] Zheng, Y.; Valdez, P. A.; Danilenko, D. M.; Hu, Y.; Sa, S. M.; Gong, Q.; Abbas, A. R.; Modrusan, Z.; Ghilardi, N.; de Sauvage, F. J. und Ouyang, W. (2008): Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens, *Nat Med* (Band 14), Nr. 3, Seite 282-9. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=18264109](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=18264109)
- [196] Cash, H. L.; Whitham, C. V.; Behrendt, C. L. und Hooper, L. V. (2006): Symbiotic bacteria direct expression of an intestinal bactericidal lectin, *Science* (Band 313), Nr. 5790, Seite 1126-30. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=16931762](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=16931762)
- [197] Dessein, R.; Gironella, M.; Vignal, C.; Peyrin-Biroulet, L.; Sokol, H.; Secher, T.; Lacas-Gervais, S.; Gratadoux, J. J.; Lafont, F.; Dagorn, J. C.; Ryffel, B.; Akira, S.; Langella, P.; Nunez, G.; Sirard, J. C.; Iovanna, J.; Simonet, M. und Chamailard, M. (2009): Toll-like receptor 2 is critical for induction of Reg3 beta expression and intestinal clearance of *Yersinia pseudotuberculosis*, *Gut* (Band 58), Nr. 6, Seite 771-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19174417](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19174417)
- [198] Loftus, E. V., Jr. und Sandborn, W. J. (2002): Epidemiology of inflammatory bowel disease, *Gastroenterol Clin North Am* (Band 31), Nr. 1, Seite 1-20. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12122726](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12122726)
- [199] Mekhjian, H. S.; Switz, D. M.; Melnyk, C. S.; Rankin, G. B. und Brooks, R. K. (1979): Clinical features and natural history of Crohn's disease, *Gastroenterology* (Band 77), Nr. 4 Pt 2, Seite 898-906. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=381094](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=381094)
- [200] Oberhuber, G. (2001): [Histology of Crohn disease type lesions in the upper gastrointestinal tract], *Pathologie* (Band 22), Nr. 2, Seite 91-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11321734](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=11321734)
- [201] Steinhardt, H. J.; Loeschke, K.; Kasper, H.; Holtermuller, K. H. und Schafer, H. (1985): European Cooperative Crohn's Disease Study (ECCDS): clinical features and natural history, *Digestion* (Band 31), Nr. 2-3, Seite 97-108. URL:

- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2860044](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=2860044)
- [202] Olsen, I.; Tollefsen, S.; Aagaard, C.; Reitan, L. J.; Bannantine, J. P.; Andersen, P.; Sollid, L. M. und Lundin, K. E. (2009): Isolation of Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis reactive CD4 T cells from intestinal biopsies of Crohn's disease patients, PLoS One (Band 4), Nr. 5, Seite e5641. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19479064](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19479064)
- [203] Fujino, S.; Andoh, A.; Bamba, S.; Ogawa, A.; Hata, K.; Araki, Y.; Bamba, T. und Fujiyama, Y. (2003): Increased expression of interleukin 17 in inflammatory bowel disease, Gut (Band 52), Nr. 1, Seite 65-70. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12477762](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12477762)
- [204] Matsuoka, K.; Inoue, N.; Sato, T.; Okamoto, S.; Hisamatsu, T.; Kishi, Y.; Sakuraba, A.; Hitotsumatsu, O.; Ogata, H.; Koganei, K.; Fukushima, T.; Kanai, T.; Watanabe, M.; Ishii, H. und Hibi, T. (2004): T-bet upregulation and subsequent interleukin 12 stimulation are essential for induction of Th1 mediated immunopathology in Crohn's disease, Gut (Band 53), Nr. 9, Seite 1303-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15306590](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=15306590)
- [205] Sandborn, W. J. und Targan, S. R. (2002): Biologic therapy of inflammatory bowel disease, Gastroenterology (Band 122), Nr. 6, Seite 1592-608. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=12016425](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=12016425)
- [206] Zenewicz, L. A.; Yancopoulos, G. D.; Valenzuela, D. M.; Murphy, A. J.; Stevens, S. und Flavell, R. A. (2008): Innate and adaptive interleukin-22 protects mice from inflammatory bowel disease, Immunity (Band 29), Nr. 6, Seite 947-57. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19100701](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=19100701)
- [207] Cooper, H. S.; Murthy, S. N.; Shah, R. S. und Sedergran, D. J. (1993): Clinicopathologic study of dextran sulfate sodium experimental murine colitis, Lab Invest (Band 69), Nr. 2, Seite 238-49. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8350599](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=8350599)
- [208] Schumann, R. R.; Leong, S. R.; Flaggs, G. W.; Gray, P. W.; Wright, S. D.; Mathison, J. C.; Tobias, P. S. und Ulevitch, R. J. (1990): Structure and function of lipopolysaccharide binding protein, Science (Band 249), Nr. 4975, Seite 1429-31.

URL:

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=2402637](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=2402637)

- [209] Myc, A.; Buck, J.; Gonin, J.; Reynolds, B.; Hammerling, U. und Emanuel, D. (1997): The level of lipopolysaccharide-binding protein is significantly increased in plasma in patients with the systemic inflammatory response syndrome, Clin Diagn Lab Immunol (Band 4), Nr. 2, Seite 113-6. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=9067641](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=9067641)
- [210] Jack, R. S.; Fan, X.; Bernheiden, M.; Rune, G.; Ehlers, M.; Weber, A.; Kirsch, G.; Mentel, R.; Füll, B.; Freudenberg, M.; Schmitz, G.; Stelter, F. und Schütt, C. (1997): Lipopolysaccharide-binding protein is required to combat a murine gram-negative bacterial infection, Nature (Band 389), Nr. 6652, Seite 742-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=9338787](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=9338787)
- [211] Schroder, N. W. und Schumann, R. R. (2005): Non-LPS targets and actions of LPS binding protein (LBP), J Endotoxin Res (Band 11), Nr. 4, Seite 237-42. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=16176661](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=16176661)
- [212] Hamann, L.; Stamme, C.; Ulmer, A. J. und Schumann, R. R. (2002): Inhibition of LPS-induced activation of alveolar macrophages by high concentrations of LPS-binding protein, Biochem Biophys Res Commun (Band 295), Nr. 2, Seite 553-60. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=12150986](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=12150986)
- [213] Lamping, N.; Dettmer, R.; Schroder, N. W.; Pfeil, D.; Hallatschek, W.; Burger, R. und Schumann, R. R. (1998): LPS-binding protein protects mice from septic shock caused by LPS or gram-negative bacteria, J Clin Invest (Band 101), Nr. 10, Seite 2065-71. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=9593762](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=9593762)
- [214] Zweigner, J.; Gramm, H. J.; Singer, O. C.; Wegscheider, K. und Schumann, R. R. (2001): High concentrations of lipopolysaccharide-binding protein in serum of patients with severe sepsis or septic shock inhibit the lipopolysaccharide response in human monocytes, Blood (Band 98), Nr. 13, Seite 3800-8. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list\\_uids=11739189](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11739189)



- [215] Grunwald, U.; Fan, X.; Jack, R. S.; Workalemahu, G.; Kallies, A.; Stelter, F. und Schutt, C. (1996): Monocytes can phagocytose Gram-negative bacteria by a CD14-dependent mechanism, *J Immunol* (Band 157), Nr. 9, Seite 4119-25. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=8892647](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=8892647)
- [216] Klein, R. D.; Su, G. L.; Schmidt, C.; Aminlari, A.; Steinstraesser, L.; Alarcon, W. H.; Zhang, H. Y. und Wang, S. C. (2000): Lipopolysaccharide-binding protein accelerates and augments Escherichia coli phagocytosis by alveolar macrophages, *J Surg Res* (Band 94), Nr. 2, Seite 159-66. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=11104656](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=11104656)
- [217] Oshitani, N.; Watanabe, K.; Nakamura, S.; Fujiwara, Y.; Higuchi, K. und Arakawa, T. (2005): Dislocation of tight junction proteins without F-actin disruption in inactive Crohn's disease, *Int J Mol Med* (Band 15), Nr. 3, Seite 407-10. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=15702229](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=15702229)
- [218] Wolk, K.; Witte, E.; Hoffmann, U.; Doecke, W. D.; Endesfelder, S.; Asadullah, K.; Sterry, W.; Volk, H. D.; Wittig, B. M. und Sabat, R. (2007): IL-22 induces lipopolysaccharide-binding protein in hepatocytes: a potential systemic role of IL-22 in Crohn's disease, *J Immunol* (Band 178), Nr. 9, Seite 5973-81. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=17442982](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=17442982)
- [219] Wolk, K.; Witte, E.; Warszawska, K.; Schulze-Tanzil, G.; Witte, K.; Philipp, S.; Kunz, S.; Docke, W. D.; Asadullah, K.; Volk, H. D.; Sterry, W. und Sabat, R. (2009): The Th17 cytokine IL-22 induces IL-20 production in keratinocytes: A novel immunological cascade with potential relevance in psoriasis, *Eur J Immunol* (Band 39), Nr. 12, Seite 3570-3581. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19830738](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=19830738)
- [220] Geboes, L.; Dumoutier, L.; Kelchtermans, H.; Schurgers, E.; Mitera, T.; Renauld, J. C. und Matthys, P. (2009): Proinflammatory role of the Th17 cytokine interleukin-22 in collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice, *Arthritis Rheum* (Band 60), Nr. 2, Seite 390-5. URL: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=19180498](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt= Citation&list_uids=19180498)



## DANKSAGUNG

Dr. Robert Sabat möchte ich für die Möglichkeit der Anfertigung meiner Promotionsarbeit in der Interdisziplinären Arbeitsgruppe Molekulare Immunpathologie danken. Ich bedanke mich auch ganz herzlich für die allseits exzellente und vielfältige Unterstützung und Betreuung durch immerwährende Diskussionsbereitschaft, Anregungen, sowie die durchgehend interessanten und lehrreichen Gespräche.

Meinen ganz besonderen Dank möchte ich Dr. Kerstin Wolk aussprechen, die mir stets zur Seite stand, für die hervorragende fachliche, engagierte und herzliche Betreuung, wertvolle Diskussionen und für die schöne und begeisternde Zusammenarbeit.

Prof. Dr. Hans-Dieter Volk möchte ich an dieser Stelle für seine Bereitschaft, die Betreuung dieser Arbeit von Seiten der Humboldt-Universität zu übernehmen und die wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit, sehr danken.

Mein Dank gilt Prof. Dr. Wolfram Sterry für die Möglichkeit der Anfertigung meiner Promotionsarbeit an der Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin und das große Interesse an meiner Arbeit.

Prof. Dr. Khusru Asadullah möchte ich für die Unterstützung der Arbeitsgruppe und für wertvolle und hilfreiche Diskussionen danken.

Prof. Dr. Gottfried Alber und PD Dr. Rotraut Mößner danke ich für die Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit.

Dr. Wolf-Dietrich Döcke und Michaela Nieter sei gedankt für die Unterstützung bei der Durchführung der *in vivo*-Versuche in der Bayer-Schering AG.

Mein Dank gilt PD Dr. Bianca Maria Wittig und Dr. Ute Hoffmann für die gute und erfolgreiche Kooperation, die Durchführung der Experimente am DSS-Kolitis-Modell und für die Entnahme und Bereitstellung von Patientenmaterial.

Ein herzliches Dankeschön gilt meiner gesamten Arbeitsgruppe. Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe danke ich für die Unterstützung, die gute Zusammenarbeit und die schöne Arbeitsatmosphäre. Allen voran danke ich Dr. Stefanie Kunz für die Hilfe beim Erlernen der Methodik, für wertvolle Ratschläge, liebevolle Aufmunterung und Freundschaft und für

die schöne Zeit auch außerhalb der Labortätigkeit. Dr. Stefanie Endesfelder danke ich für ihre warme und liebevolle Unterstützung und guten Gespräche und Rat in allen Lebenslagen. Elisabeth Wallace möchte ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und gute Laune, die den Laboralltag noch angenehmer werden ließ, danken. Ein besonderer Dank gilt auch Brigitte Ketel, Beate Pust und Annette Buß für die stetige Hilfsbereitschaft und wertvolle Unterstützung bei der Durchführung und Auswertung der *in vitro*-Experimente. Katarzyna Warszawska und Stefan Kirsch danke ich für eine angenehme Zusammenarbeit und die Hilfe beim Korrekturlesen. Tobias Gottermeier gilt mein Dank für die große Hilfe und die immerwährende Geduld bei der Lösung aller Arten von Computerproblemen und für eine schöne und unterhaltsame Zeit in den freien Minuten.

Ein besonderer Dank gilt auch Dr. Sandra Phillipp für die Entnahme und Bereitstellung von Patientenmaterial und für ihre warme und verständnisvolle Art und gutes Zuhören zu jeder Zeit.

Besonders möchte ich mich auch bei Christa Liebenthal für die liebevolle Unterstützung bei der Arbeit am Immulite und die schönen und heiteren Gespräche rund um die Natur des Menschen bedanken.

Mein großer Dank gilt vor allem meiner Familie und meinen Freunden, die alle auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Meinen lieben Eltern danke ich für ihre immerwährende Unterstützung, ihr Vertrauen und für ihren unerschütterlichen Glauben an mich und ihre Liebe, die mich während der ganzen Zeit begleitet haben. Meiner Schwester Katrin danke ich ganz besonders für den Enthusiasmus, die stetige Aufmunterung und die (auch für mich) selbstverständliche und bedingungslose Ergänzung bei allen Dingen zwischen Himmel und Erde.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meinem Freund David für seine unerschütterliche Geduld, die Kraft und Liebe bedanken.

Diese Arbeit wurde durch ein 18-monatiges Promotionsstipendium der Charité – Universitätsmedizin Berlin unterstützt.

## Veröffentlichungen

### Publikationen

Wolk K, Kunz S, Witte E, Friedrich M, Asadullah K, Sabat R. IL-22 increases the innate immunity of tissues. *Immunity* 2004. 21: 241-254

Wolk K, Witte E, Reineke U, Witte K, Friedrich M, Sterry W, Asadullah K, Volk HD, Sabat R. Is there an interaction between interleukin-10 and interleukin-22?. *Genes Immun* 2005. 6: 8-18

Wolk K\*, Witte E\*, Wallace E, Döcke WD, Kunz S, Asadullah K, Volk HD, Sterry W, Sabat R. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis. *Eur J Immunol* 2006. 36: 1309-1323

Kunz S, Wolk K, Witte E, Witte K, Döcke WD, Volk HD, Sterry W, Asadullah K, Sabat R. Interleukin (IL)-19, IL-20 and IL-24 are produced by and act on keratinocytes and are distinct from classical ILs. *Exp Dermatol* 2006. 15: 991-1004

Wolk K\*, Witte E\*, Hoffmann U, Doecke WD, Endesfelder S, Asadullah K, Sterry W, Volk HD, Wittig BM, Sabat R. IL-22 induces lipopolysaccharide-binding protein in hepatocytes: a potential systemic role of IL-22 in Crohn's Disease. *J Immunol* 2007. 178: 5973-5981

Wolk K, Witte K, Witte E, Proesch S, Schulze-Tanzil G, Nasilowska K, Thilo J, Asadullah K, Sterry W, Volk HD, Sabat R. Maturing dendritic cells are an important source of IL-29 and IL-20 that may cooperatively increase the innate immunity of keratinocytes. *J Leukoc Biol* 2008. 83: 1181-1193

Heilmann K, Hoffman U, Witte E, Loddenkemper C, Sina C, Schreiber S, Hayford C, Holzlöhner P, Wolk K, Tchatchou E, Moos V, Zeitz M, Sabat R, Günther U, Wittig BM. Osteopontin as two-sided mediator of intestinal inflammation. *J Cell mol Med* 2008. 13: 1162-1174

Schulz SM, Köhler G, Schütze N, Knauer J, Straubinger RK, Chackerian AA, Witte E, Wolk K, Sabat R, Iwakura Y, Holscher C, Müller U, Kastelein RA, Alber G. Protective

immunity to systemic infection with attenuated *Salmonella enterica* serovar enteritidis in the absence of IL-12 is associated with IL-23-dependent IL-22, but not IL-17. *J Immunol* 2008. 181: 7891-7901

Wolk K\*, Haugen HS\*, Xu W, Witte E, Waggle K, Anderson M, Vom Baur E, Witte K, Warszawska K, Philipp S, Johnson-Leger C, Volk HD, Sterry W, Sabat R. IL-22 and IL-20 are key mediators of the epidermal alterations in psoriasis while IL-17 and IFN-gamma are not. *J Mol Med* 2009. 87: 523-536

Wolk K, Witte E, Warszawska K, Schulze-Tanzil G, Witte K, Philipp S, Kunz S, Döcke WD, Asadullah K, Volk HD, Sterry W, Sabat R. The Th17 cytokine IL-22 induces IL-20 production in keratinocytes: A novel immunological cascade with potential relevance in psoriasis. *Eur J Immunol* 2009. 39: 3570-3581

Wolk K, Witte E, Witte K, Sabat R. Biology of Interleukin-22. *Semin Immunol* 2010. im Druck

\* gleicher Beitrag beider Autoren

## Vorträge

Wolk K, Witte E, Wallace E, Döcke WD, Kunz S, Asadullah K, Volk HD, Sterry W, Sabat R. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in their major target cells.

Joint Annual Meeting of the German and Scandinavian Societies for Immunology (DGFI & SSI)

Kiel, Deutschland, 21.-24. September 2005

Wolk K, Witte E, Hoffmann U, Doecke WD, Endesfelder S, Asadullah K, Sterry W, Volk HD, Wittig BM, Sabat R. IL-22 induces LBP in hepatocytes: a potential systemic role of IL-22 in Crohn's disease

37<sup>th</sup> Annual Meeting of the German Society for Immunology (DGFI)

Heidelberg, Deutschland, 05.-08. September 2007

Wolk K, Witte E, Philipp S, Witte K, Kunz S, Volk HD, Sterry W, Sabat R. The role of IL-20 in psoriasis vulgaris.

## 45. Tagung der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG)

Dresden, 29. April – 02. Mai 2009

**Poster**

Wolk K, Witte E, Reineke U, Witte K, Friedrich M, Sterry W, Asadullah K, Volk HD, Sabat R. Is there an interaction between interleukin-10 and interleukin-22?

Joint Annual Meeting of the German and Dutch Societies for Immunology (DGFI & NVVI)  
Maastricht, Niederlande, 20.-23. Oktober 2004

Wolk K, Witte E, Reineke U, Witte K, Friedrich M, Sterry W, Asadullah K, Volk HD, Sabat R. Is there an interaction between interleukin-10 and interleukin-22, two cytokines important for skin homeostasis?

XXXII. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologischer Forschung (ADF)  
Innsbruck, Österreich, 03.-05. März 2005

Wolk K, Witte E, Wallace E, Döcke WD, Kunz S, Asadullah K, Volk HD, Sterry W, Sabat R. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in their major target cells.

Joint Annual Meeting of the German and Scandinavian Societies for Immunology (DGFI & SSI)

Kiel, Deutschland, 21.-24. September 2005

Wolk K, Witte E, Wallace E, Kunz S, Döcke WD, Asadullah K, Volk HD, Sterry W, Sabat R. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis.

Psoriasis-From Gene to Clinic, 4<sup>th</sup> International Congress

London, Großbritannien, 01.-03. Dezember 2005

Wolk K, Witte E, Wallace E, Kunz S, Döcke WD, Asadullah K, Volk HD, Sterry W, Sabat R. IL-22 regulates the expression of genes responsible for antimicrobial defense, cellular differentiation, and mobility in keratinocytes: a potential role in psoriasis.

XXXIII. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologischer Forschung (ADF)

Aachen, Deutschland, 23.-25. März 2006

Wolk K, Witte E, Philipp S, Asadullah K, Volk HD, Sterry W, Sabat R. A potential role of IL-20 in psoriasis vulgaris.

XXXIV. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologischer Forschung (ADF)  
Freiburg/Breisgau, Deutschland, 08.-10. März 2007

Wolk K, Witte E, Hoffmann U, Doecke WD, Endesfelder S, Asadullah K, Sterry W, Volk HD, Wittig BM, Sabat R. IL-22 induces LBP in hepatocytes: a potential systemic role of IL-22 in Crohn's disease

37<sup>th</sup> Annual Meeting of the German Society for Immunology (DGFI)  
Heidelberg, Deutschland, 05.-08. September 2007

Schulz SM, Köhler G, Chackerian AA, Witte E, Wolk K, Sabat R, Iwakura Y, Müller U, Holscher C, Kastelein RA, Alber G. Protective immunity to systemic infection with attenuated *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in the absence of IL-12 is associated with IL-23-dependent IL-22 but not IL-17

Meeting of the Group for Research and Studies on Mediators of Inflammation (GREMI)  
Paris, Frankreich, 12. Dezember 2008

Wolk K, Witte E, Philipp S, Witte K, Kunz S, Volk HD, Sterry W, Sabat R. The role of IL-20 in psoriasis vulgaris.

45. Tagung der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG)  
Dresden, 29. April – 02. Mai 2009

Witte E, Wolk K, Haugen HS, Xu W, Waggle K, Anderson M, Vom Baur E, Witte K, Warszawska K, Philipp S, Johnson-Leger C, Volk HD, Sterry W, Sabat R. IL-22 and its downstream molecule IL-20 are key mediators of the epidermis alterations in psoriasis and represent a novel type of pathogenic cascade.

2<sup>nd</sup> European Congress of Immunology  
Berlin, Deutschland, 13.-16. September 2009

Witte E, Wolk K, Haugen HS, Xu W, Waggle K, Anderson M, Vom Baur E, Witte K, Warszawska K, Philipp S, Johnson-Leger C, Volk HD, Sterry W, Sabat R. IL-22 and its downstream molecule IL-20 are key mediators of the epidermis alterations in psoriasis and represent a novel type of pathogenic cascade.

18<sup>th</sup> Congress of the European Academy of Dermatology and Venerology  
Berlin, Deutschland, 07.-11. Oktober 2009

**ERKLÄRUNG**

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den 09.12.2009

---